



Universidade de Brasília

Instituto de Biologia

Departamento de Biologia Celular

Pós-graduação em Biologia Molecular

BIOPROSPECÇÃO DE LIPASES A PARTIR DE METAGENOMA DO SOLO E SUA APLICAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

PAULA TAVARES

2013



Universidade de Brasília

Instituto de Biologia

Departamento de Biologia Celular

Pós-graduação em Biologia Molecular

BIOPROSPECÇÃO DE LIPASES A PARTIR DE METAGENOMA DO SOLO E SUA APLICAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

PAULA TAVARES

Orientador: Ricardo Henrique Kruger

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade Federal de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

2013

**Ao meu filho Enrique, você é a razão
do meu viver.**

AGRADECIMENTOS

Ao Deus por ser, sempre, força tão presente nas tribulações da vida;

Aos meus pais e minha irmã, mesmo longe sempre me apoiaram nas minhas escolhas;

À Clovis por ser meu parceiro em todas as situações, pela compreensão, apoio e amor;

A Eleuza, Clovis, Terezinha sou muito feliz de ter vocês ao meu lado;

Ao Professor Ricardo Kruger pelo seu espírito inovador e empreendedor na tarefa de multiplicar seus conhecimentos;

Às professoras Betânia Quirino e Eliane Noronha pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho e pela participação na banca;

Ao Prof Tatsuya Nagata pela ajuda;

Aos amigos do grupo Metagenoma, em especial a Debora, obrigada pelo incentivo e de não desistir;

A Alinne por sempre estar ao meu lado;

Ao Samuel, Lucas, Juliana, Elisa, Regina, Camila, Vitoria (me perdoem se esqueci de alguém), que sempre me auxiliaram quando precisei;

Aos colegas do Laboratorio de Enzimologia, obrigada;

A Betulia que me ajudou desde o começo e me ensinou muitas coisas;

A Layssa pela ajuda aprendi muito com você;

As minhas amigas do Brasil: Thais, Leandra, Cristina, Eliane, Anali, Mariane, obrigada por estar ao meu lado sempre; Aos meus amigos do mundo: Elena, Roxana, Valentino, Alexandra.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram na execução deste trabalho.

RESUMO

O solo do Cerrado brasileiro tem sido o foco de poucos estudos sobre sua diversidade microbiana. O solo é um habitat com uma grande diversidade de microrganismos e, assim, ele pode ser usado como uma fonte de enzimas industriais. A identificação de novos genes através da abordagem metagenômica, trouxe vantagens ao desenvolvimento de enzimas com novas atividades. Lipases são um importante grupo de enzimas com várias aplicações biotecnológicas nas indústrias de detergente, alimentos, indústrias farmacêuticas e de biocombustível. Para isolar os genes putativos de lipase com tamanho pequeno de DNA (8 kb), foi realizado *screening* na biblioteca metagenômica de solo de cerrado com substrato de tributirina. A triagem funcional desta biblioteca resultou na identificação de três clones com actividade lipolitica, que foram devidamente sequenciados. Eles revelaram 4 ORFs com funções relacionadas à atividade lipolítica. Duas das enzimas lipolíticas isoladas da biblioteca de pequenos fragmentos de solo de Cerrado tiveram a sua expressão induzida em *E. coli* BL21 (DE3), sendo nomeadas LipWorfW e LipYorfY. As ORFs tem 1000 pb e codificam para 2 proteínas contendo 300 resíduos de aminoácidos com um peso molecular estimado de 30 kDa para a proteína LipWorfW e 33 kDa para a proteína LipYorfY e identidade com lipases verdadeiras. Resultado de gel de eletroforese SDS-PAGE demonstram a superexpressão destas enzimas. A determinação de sua atividade ideal e os parâmetros enzimáticos vão levar a uma análise bioquímica detalhada a fim de propor a utilização deste produto em aplicações de biodiesel, com foco na melhoria dos processos de produção. Considerando a aplicação potencial biotecnológico destas enzimas, este trabalho visa a seleção e caracterização de lipases três novos genes da biblioteca metagenômica de solo da savana vegetação adequadas para uso na produção de biodiesel.

Palavras-chave: metagenoma, solo, Cerrado, lipases

ABSTRACT

The Brazilian Cerrado soil has been the focus of very few studies about its microbial diversity. Soil is a habitat with high diversity of microorganisms and thus it can be used as a source of industrial enzymes. The identification of new genes through the metagenomic approach led to the development novel enzyme activities. The advantage of directly screening for enzymatic activities from metagenome libraries is that researchers access previously unknown genes and their encoded enzymes. Lipases are an important group of relevant enzymes as they find immense biotechnologically applications in food, detergent, pharmaceutical and biofuel industries. Lipases are mainly produced by microbes, more frequently bacterial, and play a vital role in commercial ventures. To isolate putative lipase genes a small DNA size (8 Kb), Cerrado soil metagenomic libraries were screened with tributirin. The functional screening of this library resulted in the identification of three lipase activity producing clones that were subsequently sequenced. They revealed 4 ORFs with functions related to lipolytic activity. Two lipolytic enzymes from the small DNA fragments library of Cerrado soil was isolated and their expression induced in *E. coli* strain BL21 (DE3), being named LipWorfW and LipYorfY. The open reading frame have 1000 pb and encodes a protein containing 300 amino acid residues with estimated molecular weight of 30 kDa for the LipWorfW protein and 33 kDa for the LipYorfY protein and strong identity with true lipases. SDS-PAGE gel electrophoresis demonstrates the overexpression of that lipase on inducing conditions. The determination of their optimal activity and enzymatic parameters will lead to more detailed biochemical analysis, in order to propose the use of this product in biodiesel applications, with focus on improvement of production processes. Considering the potential biotechnological application of these enzymes, this work aims at the selection and characterization of 3 novel lipases genes from metagenomic library from soil from savannah-like vegetation suitable for use in biodiesel production

Keywords: metagenome, soil, Cerrado, lipases.

SUMÁRIO

1.	Revisão bibliográfica.....	13
1.1.	Lipases.....	13
1.1.1.	Propriedades gerais das lipases	13
1.1.2.	Estrutura e o mecanismo catalítico das lipases	16
1.1.3.	Classificação das lipases verdadeiras e das carboxilesterases	19
1.1.4.	Microorganismos produtores de lipase	26
1.1.5.	Propriedades biotecnológicas das lípases.....	29
1.1.6.	Aplicações biotecnológicas das lipases	29
1.2.	Lipases Metagenômicas.....	33
1.3.	Uso das lipases metagenômicas como biocatalisadores na produção de biodiesel ...	37
1.3.1.	Matriz Energética e Mercado de Combustíveis no Brasil.....	37
1.3.2.	Programa Brasileiro de Biodiesel: diretrizes e marco regulatório.....	38
2.	Objetivos.....	44
2.1.	Objetivo Geral	44
2.2.	Objetivos Específicos	44
3.	Material e métodos.....	45
3.1.	Amostra.....	45
3.2.	Triagem funcional para enzimas lipolíticas	46
3.3.	Extração de DNA plasmidial e análise do perfil de restrição.....	46
3.4.	Confirmação do fenótipo e da atividade lipolítica	48
3.5.	Vetor de expressão pET21a(+)	49
3.6.	Preparo de células eletrocompetentes.....	50
3.7.	Sequenciamento.....	51
3.7.1.	Análise das sequências.....	53
3.7.2.	Desenho de primers e reação em cadeia da polimerase PCR da região específica.	53

3.8.	Reações de ligação ao vetor pGEM-T easy dos amplicons	55
3.8.1.	Digestão do plasmídeo e dos genes.....	56
3.8.2.	Reações de ligação ao vetor pET21a(+)	56
3.8.3.	Transformação em cepa BL21 (DE3)	57
3.8.4.	Verificação da presença do inserto.....	58
3.9.	Cinética de produção da lipase heteróloga.....	58
3.9.1.	Análise da massa molecular por SDS-PAGE.....	59
3.9.2.	Teste de solubilidade	59
3.9.3.	Western blotting.....	60
3.10.	Purificação de lipase heteróloga em condições desnaturante	60
3.10.1.	Diálise com Tampão Fosfato.....	61
4.	Resultados	62
4.1.	Confirmação dos fenótipos dos clones	62
4.2.	Extração de DNA plasmidial e análise do perfil de restrição.....	63
4.3.	Sequenciamento.....	64
4.4.	Subclonagem do LipWorfW e do LipYorfY	76
4.5.	Indução e Expressão	80
4.6.	Purificação.....	83
5.	Discussão	84
6.	Perspectivas futuras	90
Anexo I	91
Anexo II	102
Referência bibliográfica	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principais reações catalisadas por lipases.	15
Figura 2. Tipo II de secreção ou secreção mediata por secreton.....	23
Figura 3. Tipo I de secreção - ABC sistema de transporte.....	24
Figura 4. Representação esquemática do motivo estrutural conservado em enzimas da família α/β hidrolase.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 5. Mecanismo catalítico de lipases.	Erro! Indicador não definido.
Figura 6. Obtenção do (S)-Ibuprofeno.	31
Figura 7. Esquema da abordagem metagenômica com estratégias de pesquisa para acessar novos biocatalisadores	34
Figura 8. Matriz energética brasileira.....	37
Figura 9. Processo de Produção de Biodiesel.	41
Figura 10. Mapa do vetor de clonagem pCF430	45
Figura 11. Mapa físico do vetor de expressão pET-21a(+).	49
Figura 12. Região de múltipla clonagem do vetor pET-21a(+).	50
Figura 13. Maxiprep dos clones para sequenciamento	51
Figura 14. Mapa do vetor pET21a(+).	57
Figura 15. Avaliação da atividade lipolítica em placa de LB com tributirina 1% após transformação em células <i>E. coli</i> EPI-300.....	62
Figura 16. Análise eletroforética da digestão do DNA plasmidial	64
Figura 17. Árvore filogenética da LipW_orfWfamilias.....	69
Figura 18. Árvore filogenética da LipW_orfWbesthits.	70
Figura 19. Árvore filogenética da LipY_orfY.familias.....	71
Figura 20. Árvore filogenética da LipY_orfY.besthits.	72
Figura 21. Árvore filogenética da LipX_orfX.familias.....	73
Figura 22. Árvore filogenética da LipX_orfXbesthits	74
Figura 23. Árvore filogenética da LipY_orfG.	75
Figura 24. PCR utilizando primer específico para a região da lipase LipW.	76

Figura 25. Digestão do vetor de clonagem Pet21a+ e Clones apresentando insertos confirmando a ligação no vetor pGEM-T easy em gel de agarose 0,8% (TBE).	76
Figura 26. Gel de agarose apresentando o inserto confirmando a ligação no vetor pET21a (+) e clonagem em célula BL21(DE3).	78
Figura 27. Placas com meio LB-ágar suplementado com tributirina 1% (v/v).LipWorfW	79
Figura 28. Placas com meio LB-ágar suplementado com tributirina 1% (v/v).LipYorfY	79
Figura 29. Perfil de gel de eletroforese SDS-PAGE 12% corado com Coomassie G-250. Resultado do crescimento do clone LipW e do vetor pET21a (+) induzidos com IPTG.	81
Figura 30. Perfil de gel de eletroforese SDS-PAGE 12% corado com Coomassie G-250. Resultado do crescimento do clone LipY_orfY e do vetor pET21a (+) induzidos com IPTG.....	81
Figura 31. Teste de Solubilidade da lipW_orfW..	82
Figura 32. Detecção da expressão do LipW_orfW por <i>Western blotting</i>	82
Figura 33. Eletroforese em gel de poliacrilamida. Purificação da LipW_orfW	83
Figura 34. Eletroforese em gel de poliacrilamida. Dialise da Purificação da LipW_orfW, realizado com PBS1X.....	83
Figura 35. Orientação das ORF's encontradas no lipX: . Erro! Indicador não definido.	
Figura 36. Dominio conservado do LipX_orfX.....	84
Figura 37. Orientação das ORF's encontradas no lipY .. Erro! Indicador não definido.	
Figura 38. Dominio conservado do LipY_orfY.....	85
Figura 39. Dominio conservado do LipY_orfG.	86
Figura 40. Orientação das ORF's encontradas no lipW . Erro! Indicador não definido.	
Figura 41. Dominio conservado do LipW_orfW.....	87

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Sistema de classificação de enzimas lipolíticas com base em sistema proposto por Arpigny e Jaeger (1999).....	21
Tabela 2. Micro-organismos produtores de lipases relatados na literatura (1965-2012) 27	
Tabela 3. Enzimas lipolíticas identificadas a partir de bibliotecas metagenômicas	36
Tabela 4. Principais vantagens e desvantagens do uso de um catalisador químico ou enzimático	42
Tabela 5. Oligonucleotídeos construídos para o sequenciamento dos clones X e Y para as extremidades do vetor PCF430.....	52
Tabela 6. Desenho de primers que flanqueiam a região do genoma referente as lipases dos Clones X, Clone Y e Clone W.	55
Tabela 7. Prováveis genes identificados nos insertos metagenômicos do clone X....	65
Tabela 8. : Prováveis genes identificados nos insertos metagenômicos do clone Y..	65
Tabela 9. Prováveis genes identificados nos insertos metagenômicos do clone W...	65

LISTA DE ABREVIATURAS

aa – amino ácidos
β – beta
C° – graus Celsius
CMC – carboximetil celulose
DNA – ácido desoxirribonucléico
DNS – ácido dinitrosalicílico
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
g – constante de gravidade
g – gramas
kg – quilogramas
kb – kilo bases
kDa – kilo Daltons
LB – Luria Bertani
μg – microgramas
μL – microlitros
mg – miligramas
mL – mililitros
m/v – massa por volume
ORF – *open reading frame*
RNA – ácido ribonucléico
TBE – tampão tris, ácido bórico e EDTA
TAE – tampão tris, acetato e EDTA
v/v – volume por volume **CTAB** Cetiltrimetilamonio Bromido
DNA cido Desoxirribonucléico
dNTPs Deoxirribonucleosídeo Trifosfato
EDTA Etileno Diamino Acetato Dissódico
IPTG Isopropil-beta-D-Tiogalactopiranosídeo
M Molar
mA Miliampere
mg Miligrama
mM Micromolar
OD Densidade óptica
PB Pares de base
PCR Reação em cadeia de polimerase
pH Potencial hidrogeniônico
pmol Picomol
RNase Ribonuclease
rpm Rotações por minuto
SDS Dodecil Sulfato de Sódio
TAE Tris-Acetato-EDTA
TBE Tris-Borato-EDTA
TE Tris-EDTA
UV Radiação Ultravioleta
V Volts

1. Revisão bibliográfica

1.1. Lipases

1.1.1. Propriedades gerais das lipases

As lipases são reconhecidas como um grupo de biocatalisadores em biotecnologia devido à sua alta versatilidade. Elas podem ser aplicadas em diferentes indústrias, como no processamento de alimentos, detergentes e síntese de produtos para química fina e fármacos, processamento de óleos e gorduras e produção de cosméticos, além de serem utilizadas no tratamento de efluentes gordurosos. Lipase é a designação comum para um grupo de enzimas pertencentes à classe das hidrolases (E.C. 3.1) e que catalisam a hidrólise de ligações éster (E.C. 3.1.1), são largamente distribuídas entre bactérias, fungos, plantas e animais. As lipases microbianas exibem especificidade ao substrato, uma propriedade que parece ter evoluído para assegurar o acesso de microrganismos produtores de lipase a diversas fontes de carbono durante a degradação da parede celular da planta ou durante a reciclagem de nutrientes contendo lipídios (Bornscheuer, 2002).

Em geral, as lipases agem em um pH neutro ou alcalino, embora existam alguns exceções (Bornscheuer, 2002; Ramani et al., 2010). As lipases agem geralmente na temperatura no intervalo de 30-60 °C e mostram atividade térmica até 60 °C, mas variações de temperaturas inferior e superior foram relatados principalmente para lipases termofílicas de *Bacillus* (Sunna et al., 2002). Além disso, a estabilidade térmica de lipases pode ser reforçada com a adição de estabilizantes como o etileno-glicol, sorbitol ou glicerol (Mine et al., 2001). As lipases são frequentemente estáveis em solventes orgânicos com algumas exceções de estimulação ou inibição (Dandavate et al., 2009.; Gupta et al., 2004). Cofatores geralmente não são necessários para ativar as lipases, mas cátions divalentes, tais como cálcio, podem frequentemente aumentar a atividade da enzima. Além disso, atividade de lipase é, em geral, inibida drasticamente por metais pesados, como o Co, Ni, Hg e Sn e ligeiramente inibida por Zn e Mg (Bahrum et al., 2006).

A especificidade das lipases é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação enzima-substrato (Jensen et al., 1983). As diferentes combinações destes elementos criam vários tipos de especificidade. Por exemplo, ao substrato a enzima apresenta diferentes taxas de hidrólise sobre triacilgliceróis, diacilgliceróis ou monoacilgliceróis. A enzima pode apresentar também especificidade posicional quando a hidrólise ocorrida diferentemente sobre ésteres primários, secundários ou terciários, ou pode ser inespecífica, liberando ácidos graxos das três posições. Por outro lado, pode-se perceber a estereoespecificidade de uma enzima a partir da discriminação entre enantiômeros no caso de substratos racêmicos. Por fim, a especificidade também pode ser relacionada aos ácidos graxos que compõem o substrato, quando houver preferência por ácidos graxos específicos, principalmente quanto ao comprimento da cadeia e número de insaturações.

A utilização e o interesse por lipases advêm da capacidade de catalisar diferentes reações, tanto em meio aquoso, reações de hidrólise, como em meio orgânico, com teor de água restrito, como reações de esterificação, transesterificação (alcoólise, acidólise), interesterificação, aminólise (síntese de amidas), e a lactonização (Krieger *et al.*, 2004; Jaeger; Reetz, 1998). A Figura 1 ilustra as principais reações catalisadas por lipases.

As enzimas lipolíticas podem ser classificadas como: as carboxilesterases e as lipases verdadeiras que diferem em relação à sua capacidade de catalisar a hidrólise de ligações ésteres de ácidos graxos. No entanto, outras enzimas podem hidrolisar acilglicerol como as cutinases e fosfolipases e são consideradas por alguns autores como enzimas lipolíticas (Fojan et al., 2000).

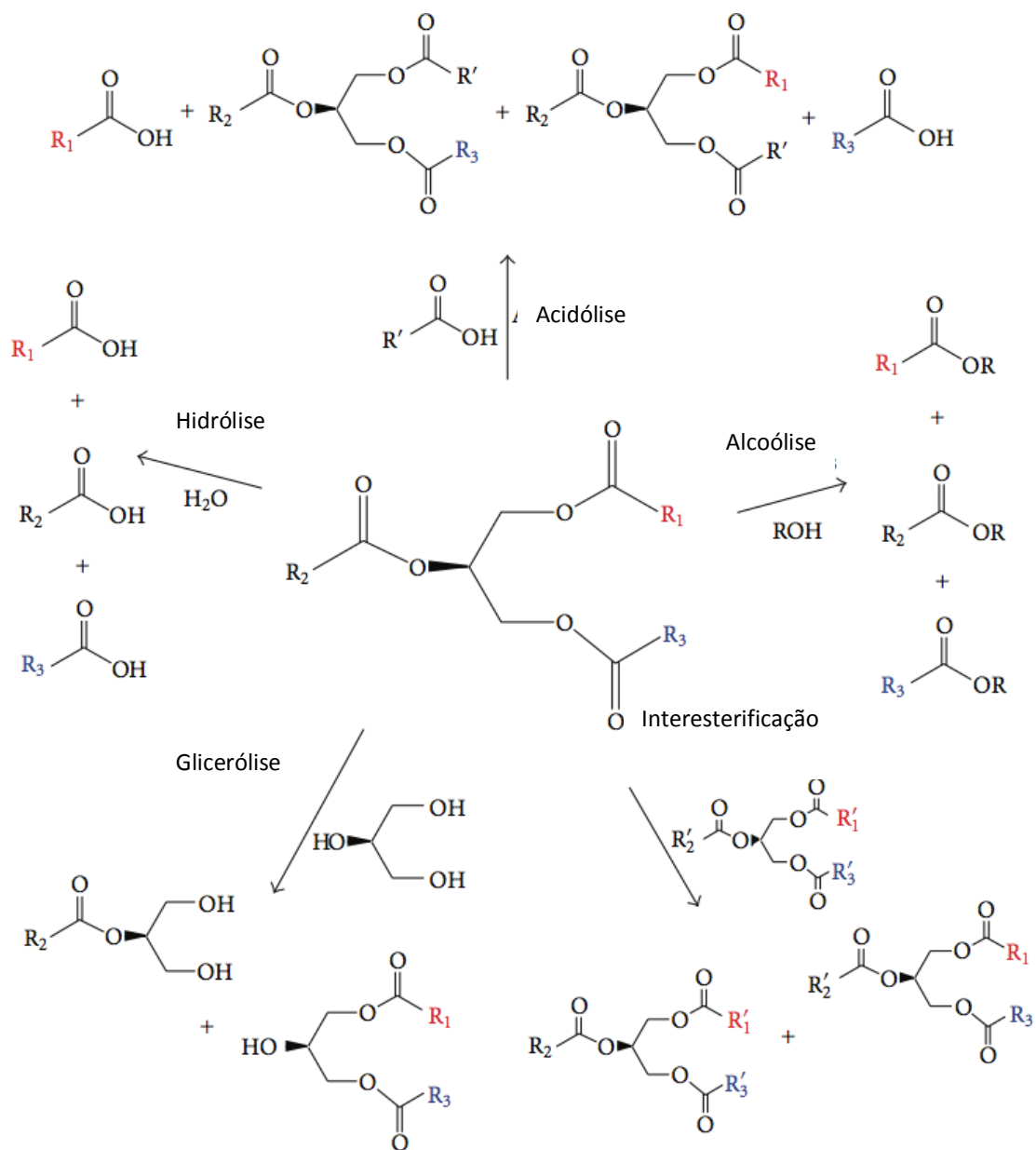


Figura 1. Principais reações catalisadas por lípases (Adaptada de Ribeiro et al., 2011).

1.1.2. Estrutura e o mecanismo catalítico das lipases

A estrutura terciária das lipases é caracterizada pela presença de um domínio estrutural do tipo α/β hidrolase (Schrag e Cygler, 1997) (Figura 2). Este tipo de estrutura apresenta um núcleo central composto por fitas paralelas intercaladas por porções em α - hélice. O sítio catalítico das lipases é composto por uma tríade catalítica (G-X1-S-X2-G, onde G=glicina; S=serina; X1=histidina e X2=ácido glutâmico ou aspártico). O nucleófilo catalítico (serina) está localizado no lado C-terminal das fitas β é responsável pela catálise e está unido por ligações de hidrogênio a um resíduo de histidina; o resíduo ácido carboxilado ligado ao mesmo resíduo de histidina poderá ser um aspartato ou glutamato.

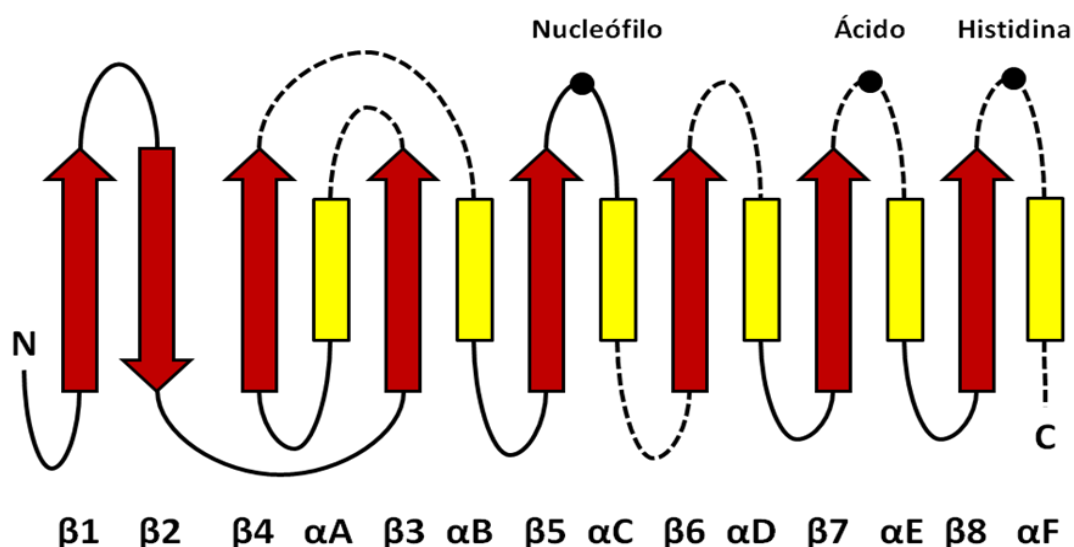


Figura 2. Representação esquemática do motivo estrutural conservado em enzimas da família α/β hidrolase, tem o núcleo central formado por uma folha β central, consistindo de oito diferentes fitas β (β 1- β 8), conectadas com seis α hélices (A-F), os aminoácidos da tríade catalítica estão indicadas pelos círculos preenchidos (Adaptado de Pouderoyen et al., 2001).

As lipases apresentam em sua estrutura uma cadeia denominada *flap*, *lid* ou “tampa” hidrofóbica. A cadeia está inserida na histidina da tríade catalítica e prolonga-se sobre o núcleo central de fitas e sobre o sítio catalítico, cobrindo o sítio.

As lipases podem ter três conformações diferentes: (a) Conformações fechadas; (b) Conformações abertas; e (c) Conformação aberta com a *lid* não estabilizada.

As conformações fechadas, com a *lid* cobrindo o sítio ativo, são caracterizadas por um sítio ativo desocupado preenchido por moléculas de solvente. A superfície de contato entre a *lid* e a estrutura da proteína é complementar, com exceção da região próxima ao nucleófilo, onde frequentemente se encontra uma cavidade.

Por sua vez, as conformações abertas, com a *lid* estabilizada por ligações covalentes ou com detergente ligado ao sítio ativo, o movimento da *lid* não só permite acesso ao sítio ativo, mas também expõe a superfície hidrofóbica, deixando a superfície escondida.

Por fim, as conformações abertas com a *lid* não estabilizada (Brzozowski et al., 2000).

Devido ao forte caráter hidrofóbico da *lid* e à sua posição sobre o sítio ativo, foi proposto que ele estaria envolvido no mecanismo de catálise das lipases. Quando em presença de uma superfície óleo/água, a *lid* pode interagir com a interface, sofrer uma alteração conformacional que move a *lid* tornando o sítio ativo exposto. Lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B apresentam a tampa *lid*; outras lipases, entretanto, podem não apresentá-la, como lipases de *Bacillus*.

A *lid* por muito tempo foi associada ao fenômeno de ativação interfacial em lipases. Entretanto, sabe-se que o fato das lipases apresentarem ou não *lid* não interfere em sua atividade hidrolítica e que a “tampa” não está necessariamente relacionada com a ativação interfacial. As cutinases, enzimas consideradas lipases “verdadeiras”, não apresentam a *lid* e não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica (Cygler e Schrag, 1997).

Lipases são hidrolases que atuam em ligações éster presentes em acilgliceróis para liberar ácidos graxos e glicerol. Figura 3:

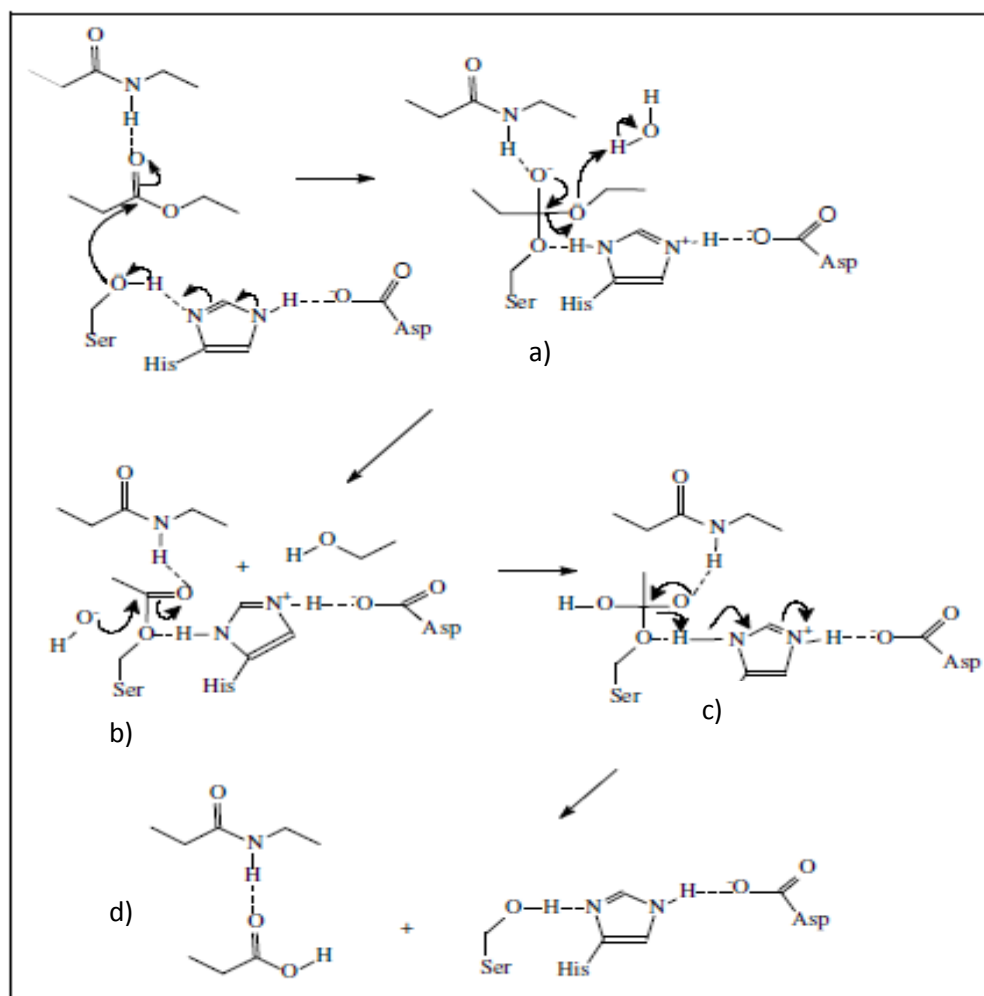


Figura 3. Mecanismo catalítico de lipases (Adaptado de Jaeger et al., 1994).

Conforme se depreende da figura acima, a reação catalisada por estas enzimas ocorre em varias etapas.

Inicialmente, a hidrólise começa com a ligação de lipídios e a ativação de uma serina nucleofílica por uma histidina, um próton da hidroxila da serina é transferido. O “lid” hidrofóbico aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila da serina do sítio catalítico. Ocorre, então, um ataque nucleofílico do oxigênio da

hidroxila serínica ao carbono carbonílico da ligação éster da cadeia do substrato, formando um intermediário tetraédrico.

Em seguida, o intermediário tetraédrico é formado pela carga negativa do átomo de oxigênio do carbonila da ligação éster. O intermediário tetraédrico é estabilizado por duas pontes de hidrogênio dos resíduos catalíticos de His e Asp um álcool é liberado, deixando um complexo acil-enzima.

A próxima etapa é a etapa de deacetilação, em que uma molécula de água hidrolisa o intermediário covalente (enzima acil) e o componente ácido do substrato é esterificado ao resíduo de serina na enzima. A histidina doa um próton ao componente álcool que está deixando o substrato restando então um intermediário covalente (enzima acilada), estando o componente ácido do substrato esterificado pelo resíduo serina da enzima. O resíduo histidina ativa uma molécula de água na vizinhança e o íon hidroxila resultante realiza um ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila do intermediário covalente

Por fim, um próton é doado pelo resíduo histidina ao átomo de oxigênio do resíduo serina ativo, quebrando a ligação éster entre a serina e o componente acila, liberando o produto acilado, favorecendo a enzima, para que esta receba uma nova molécula de substrato. Após a difusão do produto acil, a enzima está pronta para outra rodada de catálise.

1.1.3. Classificação das lipases verdadeiras e das carboxilesterases

Diferentes critérios podem ser utilizados para classificar as lipases (E.C.3.1.1). Considerando a especificidade do substrato um critério para esta distinção (Bornscheuer, 2002). Lipases podem ser diferenciadas das esterases por catalisarem a hidrólise de ligações éster com triacilgliceróis de cadeias com mais de 10 carbonos, tendo-se a trioleína como substrato padrão, enquanto as esterases catalisam a hidrólise de triacilgliceróis constituídos por ácidos graxos de menos de 10 carbonos, tendo-se a tributirina como substrato padrão (Jaeger et al., 1999). Um tamanho reduzido do sítio de ligação levaria a reações entre os esteres com o substrato, enquanto aumentar seu tamanho iria deixar espaço

livre, o que levaria à não ligação dos substratos e diminuição da atividade. A especificidade destas enzimas ao substrato está diretamente correlacionada com a preferência diferente das lipases verdadeiras e esterases quanto a hidrofobicidade e o estado físico de seus substratos. Portanto, lipases verdadeiras preferem substratos altamente hidrofóbicos, que são insolúveis em água e tendem a formar agregados (Bornscheuer, 2002; Fojan et al., 2000; Villeneuve, 2007). A atividade de lipase verdadeira é frequentemente correlacionada diretamente com área de substrato e não com a concentração de substrato (Cernia et al., 2004; Laszlo e Evans, 2007). A atividade enzimática das esterases está restrita à hidrólise de ligações éster em substratos solúveis em água (Bornscheuer, 2002; Fojan et al., 2000).

Ativação interfacial é um fenômeno único associado com lipases verdadeiras. O fenômeno da ativação interfacial foi descrito por Holwerda *et al.*, (1936) e Schonheyder e Volqvartz (1945). Medindo a atividade da lipase pancreática utilizando como substrato a tricaproína, os autores observaram que a hidrólise era aumentada quando a concentração do substrato excedia o limite de solubilidade. Este comportamento foi chamado de ativação interfacial. Em 1958, Sarda e Desnuelle observaram que esterases eram ativas somente sobre substratos molecularmente dispersos, enquanto lipases constituíam uma classe especial de esterases que apresentavam maior atividade sobre substratos formando agregados. Desta forma, foi estipulado que o fenômeno da ativação interfacial seria uma característica das lipases que as distinguiria de outras esterases.

As lipases verdadeiras e as esterases têm pontos isoelétricos e a composição dos resíduos de aminoácido semelhantes. No entanto, se a acessibilidade ao solvente é levada em conta, algumas diferenças entre elas são encontradas em relação aos aminoácidos mais expostos ao solvente. As esterases mostram uma diminuição de resíduos não-polares com o aumento da acessibilidade ao solvente, uma característica habitualmente observada em proteínas solúveis em água.

Por outro lado, as lipases verdadeiras exibem um aumento do teor de resíduos apolares em torno de 50–80%, diminuindo a acessibilidade ao solvente. Estes resíduos hidrofóbicos (valina, leucina e isoleucina) são

encontrados principalmente juntos no hemisfério da proteína, onde se encontra o sítio ativo e eles podem facilitar a fixação de lipase ao substrato hidrofóbico agregado (Fojan et al., 2000). As lipases verdadeiras, diferentemente das esterases, mostram um maior teor de aminoácidos não-polares pequenos no sítio ativo, melhorando a interação entre a enzima e seus substratos quando a tampa se move (Fojan et al., 2000).

Considerando a dificuldade na classificação de lipase com base no mecanismo de reação, Arpigny e Jaeger (1999) propuseram um sistema de classificação baseado na similaridade de sequências das diversas enzimas com a lipase de *Pseudomonas aeruginosa* (100%). As sequências de aminoácidos e nucleotídeos foram obtidas a partir dos dados depositados no NCBI e a comparação entre elas foi realizada com o programa BLAST 2.0. A classificação inclui 8 famílias de enzimas lipolíticas (Tabela 1).

Tabela 1. Sistema de classificação de enzimas lipolíticas com base em sistema proposto por Arpigny e Jaeger (1999)

Família	Subfamília	Cepas produtoras de lipases	N. acceso	Família	Subfamília
I	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	D50587	100	
		<i>Pseudomonas fluorescens C9</i>	AF031226	95	
		<i>Vibrio cholerae</i>	X16945	57	
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	X80800	43	
		<i>Pseudomonas fragi</i>	X14033	40	
		<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>	U88907	39	
		<i>Proteus vulgaris</i>	U33845	38	
	2	<i>Burkholderia glumae</i>	X70354	35	100
		<i>Chromobacterium viscosum</i>	Q05489	35	100
		<i>Burkholderia cepacia</i>	M58494	33	78
		<i>Pseudomonas luteola</i>	AF050153	33	77
	3	<i>Pseudomonas fluorescens SIK W1</i>	D11455	14	100
		<i>Serratia marcescens</i>	D13253	15	51
	4	<i>Bacillus subtilis</i>	M74010	16	100
		<i>Bacillus pumilus</i>	A34992	13	80
	5	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	U78785	15	100
		<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	X95309	14	94
		<i>Staphylococcus hyicus</i>	X02844	15	29
		<i>Staphylococcus aureus</i>	M12715	14	28
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AF090142	13	26
	6	<i>Propionibacterium acnes</i>	X99255	14	100
		<i>Streptomyces cinnamomeus</i>	U80063	14	50
II		<i>Aeromonas hydrophila</i>	P10480	100	

	<i>Streptomyces scabies</i>	M57297	36
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AF005091	35
	<i>Salmonella typhimurium</i>	AF047014	28
	<i>Photobacterium luminescens</i>	X66379	28
III	<i>Streptomyces exfoliatus</i>	M86351	100
	<i>Streptomyces albus</i>	U03114	82
	<i>Moraxella</i> sp.	X53053	33
IV (HSL)	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	X62835	100
	<i>Pseudomonas</i> sp. B11-1	AF034088	54
	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AE000985	48
	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	L36817	40
	<i>Escherichia coli</i>	AE000153	36
	<i>Moraxella</i> sp.	X53868	25
V	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	M58445	100
	<i>Haemophilus influenzae</i>	U32704	41
	<i>Psychrobacter immobilis</i>	X67712	34
	<i>Moraxella</i> sp.	X53869	34
	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	AF071233	32
VI	<i>Synechocystis</i> sp.	D90904	100
	<i>Spirulina platensis</i>	S70419	50
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	S79600	24
	<i>Rickettsia prowazekii</i>	Y11778	20
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	AE001287	16
VII	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Q01470	100
	<i>Bacillus subtilis</i>	P37967	48
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	CAA22794	45
VIII	<i>Arthrobacter globiformis</i>	AAA99492	100
	<i>Streptomyces chrysomallus</i>	CAA78842	43
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIK W1	AAC60471	40

A família I inclui lipases de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, a maioria delas são lipases verdadeiras. A família I está dividida em 7 sub-famílias. Subfamílias I.1, I.2 e I.3 incluem lipases verdadeiras com um peso molecular de 30-32 kDa.

Lipases das subfamílias I.1 e I.2 têm uma sequência N-terminal que é utilizada para uma secreção eficiente através da membrana interna por um mecanismo Sec dependente. Todas as proteínas secretadas pela via Sec-dependente possuem peptídeo sinal, que funciona tanto no direcionamento quanto no reconhecimento do peptídeo pela translocase. Este processo é mediado pelas proteínas Dsf que catalisam a formação de pontes de sulfeto. Finalmente, as lipases são transportadas através da membrana externa com a

ajuda de uma maquinaria complexa denominada *secretion* que contém diversas proteínas. Esse mecanismo de secreção que necessita de uma *chaperona* ou *foldase*, denominada de Lif, auxilia no seu dobramento correto, pois sem ela a lipase pode apresentar-se inativa. A inativação é neste caso explicada pela formação de corpos de inclusão, que, para algumas famílias de lipases, pode estar diretamente relacionada à ausência da expressão de genes de *foldases* associados a genes de lipases (Figura 4).

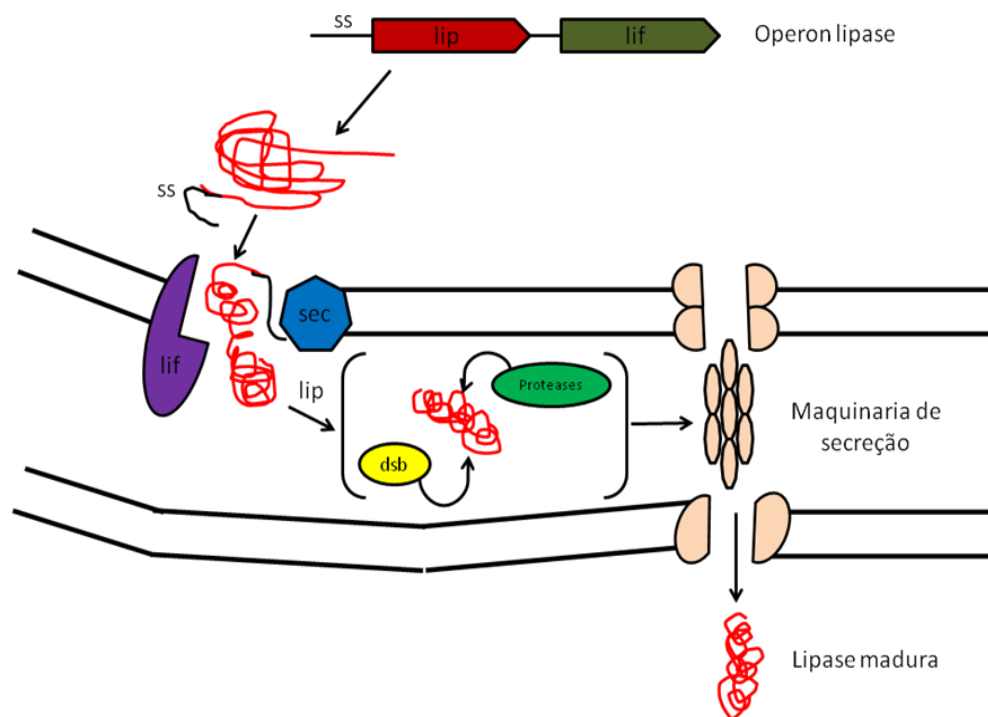


Figura 4. Tipo II de secreção ou secreção mediata por secretion, o sistema Sec está envolvido na translocação de proteínas através da membrana citoplasmática e na inserção de proteínas integrais de membrana. (Adaptado de Rosenau e Jaeger 2000).

As lipases da Subfamília I.3 são secretadas pelo tipo I (ABC sistema de transporte) (Arpigny Jaeger, 1999). O percurso da secreção do tipo I inclui três proteínas diferentes: a) a membrana interna, a ATPase confere ao substrato especificidade; b) a proteína de fusão membrana (MFP), que funciona como uma ponte entre a membrana interna e externa sendo ligada a ambas; e c) a última proteína, que está na membrana externa. As lipases são secretadas diretamente para o espaço extracelular por este sistema em que não há

necessidade da formação de intermediários periplásmicos enzimaticamente ativos que aparecem na secreção de tipo II na Figura 5. (Rosenau e Jaeger 2000).

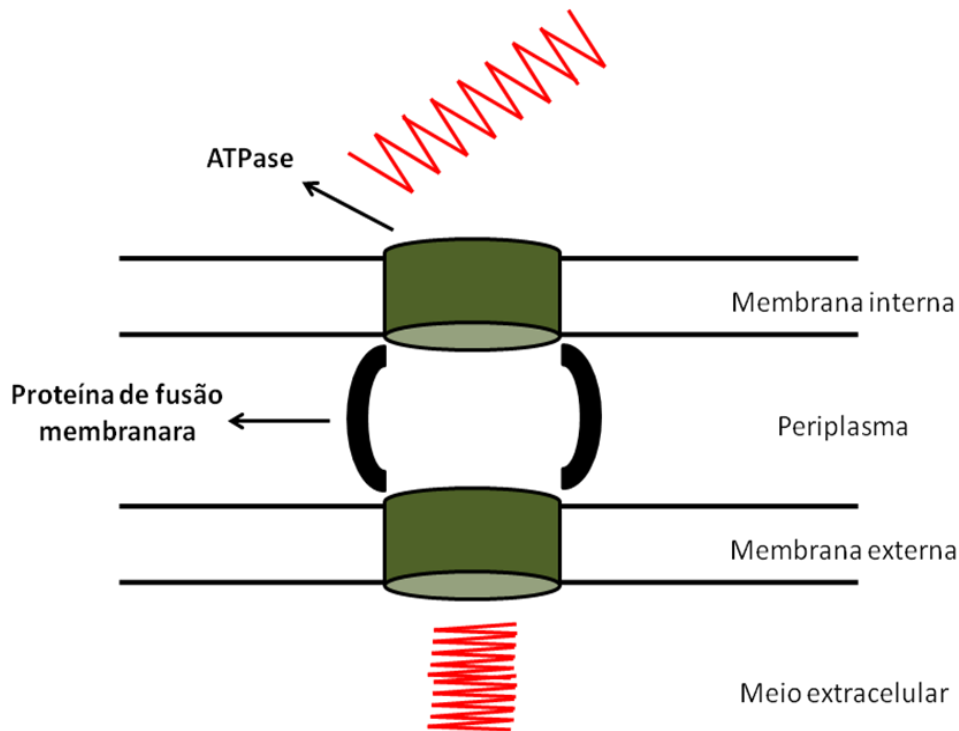


Figura 5. Tipo I de secreção - ABC sistema de transporte (Adaptada de Arpigny e Jaeger, 1999).

A sub-família I.4 inclui lipases de *Bacillus* mesófilos enquanto na sub-família I.5 estão as lipases de *Staphylococcus* e de cepas termófilas de *Bacillus thermocatenuatus* (Arpigny e Jaeger, 1999 e Eggert et al., 2001). As lipases destas famílias apresentam similaridade com a lipase de *P. aeruginosa* em torno de 16%. Lipases das espécies de *Bacillus* são mesófilas e são as menores lipases (~ 20 kDa) conhecidas e possuem muito pouca semelhança de sequência com outras lipases de *Bacillus*. Estas enzimas possuem a característica comum de apresentar uma Ala no lugar da Gly na sequência do pentapeptídeo conservado que contém a Ser. A sequência usual é G-X-S-X-G, enquanto nas lipases de *Bacillus* a sequência é A-X-S-X-G. Lipases do gênero *Geobacillus* geralmente são espécies termo e alcalofílica e têm uma massa molecular de aproximadamente 45 kDa, exibindo uma atividade máxima no pH

9,0 e a 65 ° C. As lipases da Subfamília do grupo I.6 são lipases estafilocócicas, sendo enzimas grandes de 75 kDa que são secretadas como precursores. O pró-peptídeo (~ 260 resíduos) é uma chaperona intramolecular que facilitam a dobradura e a secreção da enzima. Ela é clivada no meio extracelular por uma protease específica, dando origem a uma proteína madura de cerca de 400 resíduos de aminoácidos. A lipase de *S. Hyicus*, que faz parte dessa família, também exibe atividade de fosfolipase, que é única entre lipases verdadeiras (Arpigny e Jaeger, 1999). A família I.6 inclui as lipases de *Propionibacterium acnes* (339 resíduos) e a de *Streptomyces cinnamoneus* (275 resíduos), que mostram semelhança significativa entre si. Sua região central (50-150 resíduos) mostra 50% de similaridade com as lipases da subfamília I.2 e as lipases pequenas de *B. subtilis* que pertencem a subfamília I.4 (Arpigny e Jaeger, 1999).

As enzimas agrupadas na família II não exibem o convencional pentapeptídeo Gly-Xaa-Xaa-Ser-Gly. Eles apresentam um Gly-Asp-Ser-Leu tendo uma serina no sítio ativo, muito mais perto do terminal N que na outras enzimas lipolíticas. Um membro muito interessante dessa família é a esterase de *S. sarna* que, em contraste com a maioria das lipases, contém uma díade catalítica de Ser-His. (Arpigny e Jaeger, 1999).

A família III inclui lipases extracelulares psicrofílicas de *Moraxella sp.* e de várias espécies de *Streptomyces*.

As enzimas da família IV, chamadas HSL (lipase hormônio-sensível) são família que exibem sequências de aminoácidos semelhantes aos de lípases hormônio- sensíveis dos eucariotos, essas sequências foram relacionadas à adaptação ao frio, embora esta família incluía também enzimas mesofílicas e termofílicas (Arpigny e Jaeger, 1999; Bornscheuer, 2002).

Enzimas classificadas como da família V também provém de bactérias psicrofílicas e mesofílicas. Eles partilham semelhanças de sequência de aminoácidos significativa (20-25%) com várias enzimas bacterianas não lipolíticas.

As enzimas da família VI estão entre as menores carboxilesterases conhecidos com massa molecular de 23-26 kDa (Arpigny e Jaeger, 1999).

A família VII inclui esterases grandes (50-65 kDa), com similaridade de sequência com esterases eucarióticas do intestino e com carboxilesterases do fígado.

Finalmente, a família VIII é formada por três enzimas de cerca de 380 resíduos que mostram uma impressionante semelhança com classe C β -lactamases. Duas delas têm o pentapeptídeo Gly-Xaa-Ser-Ala-Gly não seguido por uma histidina e localizado perto do terminal-C da proteína (Arpigny e Jaeger, 1999; Bornscheuer, 2002).

1.1.4. Microorganismos produtores de lipase

Claude Bernard (1856) isolou pela primeira vez a lipase de suco pancreático e verificou que esta enzima solubilizava gotas de óleo. Anos mais tarde, o interesse pelas lipases microbianas aumentou devido à estabilidade e facilidade de obtenção em comparação com as de origem animal (Hasan et al., 2006). Nos micro-organismos, as lipases podem apresentar atividade fosfolipídica, sendo utilizadas como mecanismo de defesa, visto que quando secretadas, proporcionam competição com a microflora; facilitam a hidrólise dos lipídeos e os ácidos graxos livres liberados auxiliam na adesão tecidual célula-célula e célula-hospedeiro (Stehr et al., 2003). As principais fontes de obtenção de lipases para aplicação industrial têm sido os microorganismos eucariotos (leveduras e fungos) e procariotos (bactérias, incluindo-se os actinomicetos) como ilustrado na Tabela 2.

Tabela 2. Micro-organismos produtores de lipases

Fonte	Micro-organismos	Referências
Arqueobactérias	<i>Natronococcus sp.</i>	Boutaiba <i>et al.</i> , (2006)
Bactérias	<i>Bacillus stearothermophilus</i> MC 7	Kambourova <i>et al.</i> , (2003)
(Gram-positivas)	<i>B. megaterium</i>	Lima <i>et al.</i> , (2004)
	<i>Burkholderia glumae</i>	Khattabi <i>et al.</i> , (2003)
	<i>B. cepacia</i>	Fernandes <i>et al.</i> , (2007)
	<i>Ralstonia sp.</i>	Yoo <i>et al.</i> , (2011)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Shah e Wilson, (1965)
	<i>S. epidermidis</i>	Simons <i>et al.</i> , (1998)
	<i>S. xylosus</i>	Mosbah <i>et al.</i> , (2007)
Bactérias	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Jaeger e Reetz, (1998)
(Gram-negativas)	<i>Photobacterium lipolyticum</i>	Yang, Sohn e Kim, (2009)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Jaeger <i>et al.</i> , (1997)
	<i>P. mendocina</i>	Jaeger e Reetz, (1998)
	<i>P. fluorescens</i> HU380	Kojima e Shimizu (2003)
	<i>Serratia marcescens</i>	Jaeger <i>et al.</i> , (1997)
Actinomicetos	<i>Streptomyces cinnamomeus</i> Tü89	Sommer, Bormann e Götz (1997)
	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	Côté e Shareck (2008)
Fungos	<i>Candida rugosa</i>	Dalmau <i>et al.</i> , (2000)
leveduriformes	<i>C. cylindracea</i>	Brozzoli <i>et al.</i> , (2009)
	<i>Torulopsis ernobii</i>	Yoshida, Motai e Ichishima (1968)
	<i>Issatchenkia orientalis</i>	Costas, Deive e Longo (2004)
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Domínguez <i>et al.</i> , (2003)
Fungos	<i>Antrodia cinnamomea</i>	Lin, Wang e Sung (2006)
filamentosos	<i>Alternaria sp.</i>	Tom e Crisan (1975)
	<i>Aspergillus carneus</i>	Saxena <i>et al.</i> , (2003)

<i>A. terreus</i>	Gulati <i>et al.</i> , (1999)
<i>A. niger</i>	Edwinoliver <i>et al.</i> , (2010)
<i>A. oryzae</i>	Toida <i>et al.</i> , (2000)
<i>Beauveria bassiana</i>	Hegedus e Khachatourians, (1988)
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	Messias <i>et al.</i> , (2009)
<i>B. ribis</i>	Messias <i>et al.</i> , (2009)
<i>Botrytis cinerea</i>	Comménil <i>et al.</i> , (1999)
<i>Cunninghamella verticillata</i>	Gopinath <i>et al.</i> , (2002)
<i>Geotrichum sp.</i>	Burket <i>et al.</i> , (2004)
<i>Fusarium globulosum</i>	Gulati <i>et al.</i> , (2005)
<i>F. oxysporum</i>	Prazeres, Cruz e Pastore (2006)
<i>Mucor circinelloides</i>	Szczesna-Antczak <i>et al.</i> , (2006)
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Lima <i>et al.</i> , (2003)
<i>P. citrium</i>	Miranda <i>et al.</i> , (1999)
<i>P. restrictum</i>	Cammarota e Freire (2006)
<i>P. simplicissimum</i>	Guitarra <i>et al.</i> , (2007)
<i>P. verrucosum</i>	Kempka <i>et al.</i> , (2008)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Jaeger e Reetz (1998)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Li, Wang e Tan (2006)
<i>R. chinensis</i>	Sun e Xu (2009)
<i>R. delemar</i>	Açikel, Ersan e Açikel, (2010)
<i>R. homothallicus</i>	Diaz <i>et al.</i> , (2006)
<i>R. oryzae</i>	Essamrl, Deyris e Comeau (1998)
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Fernandes <i>et al.</i> , (2004)
<i>Trichoderma viride</i>	Kashmiri, Adnan e Butt (2006)

1.1.5. Propriedades biotecnológicas das lipases

As razões para o uso das lipases em biotecnologia são várias, estando as principais descritas a seguir.

Em primeiro lugar é possível destacar sua versatilidade. Lipases são biocatalisadores muito versáteis que podem realizar reações de hidrólise muito diferentes e, em solventes orgânicos, de síntese e de troca de acilo, utilizando varios substratos (Jochens et al., 2011). Além disso, a sua estrutura e função é bem conhecida e podem ser modificados para se adaptarem para novas aplicações (Jaeger e Eggert, 2004; Prasad et al., 2011). A especificidade e a seletividade também são fatores importantes. Algumas lipases mostram especificidade do substrato e alta quimo-régio e estereo-selectividade (Patel, 2008). Em paralelo, tem-se a ausência de subprodutos pelas lipases, uma vez que, em sua maioria, não realizam reações laterais (Gotor-Fernández et al., 2006; Jaeger e Eggert, 2002). Neste mesmo sentido, a maioria lipases não requer cofatores (Hasan et al., 2006).

Ainda sobre suas características específicas, tem-se que as lipases são ativas e estáveis em solventes orgânicos e ao longo de uma vasta gama de pH e temperaturas (Doukyu e Ogino, 2010).

Adicionalmente às razões que envolvem a lipase em si, é importante mencionar que as lipases estão disponíveis em grandes quantidades por processos de fermentação de vários substratos. (Gupta et al., 2004), e que processos que envolvem a utilização de lipases têm um baixo custo e são menos poluentes (Lotti e Alberghina, 2007).

1.1.6. Aplicações biotecnológicas das lipases

As lipases se diferenciam por catalisar reações de síntese, além das suas reações hidrolíticas naturais sobre lipídeos, o que as torna atrativas para aplicações em segmentos industriais bastante diversificados.

Lipases encontraram amplas aplicações na indústria alimentar moderna. As lipases são comumente utilizadas na produção de uma variedade de produtos como os sucos de frutas, alimentos embutidos, legumes fermentados,

queijos, manteiga, molhos e sopas. Nos dias atuais, gordura e óleos modificados são bastante usados na indústria de processamento de alimentos que exigem novas tecnologias economicamente viáveis e ambientalmente sustentáveis. Os óleos vegetais com triacilgliceróis nutricionais estruturados e com as propriedades físico-químicas alteradas tem um grande potencial no mercado (Gupta et al., 2004).

As lipases têm também sido utilizadas para a adição aos alimentos ou modificar sabores (Macedo et al., 2003). As lipases têm sido utilizadas para o refino do arroz, modificações do leite de soja e a melhoria do aroma e acelerar a fermentação do vinagre de maçã. Na indústria de laticínios, as lipases são empregadas para a hidrólise da gordura do leite. As aplicações incluem a melhoria do sabor e a aceleração do processo de cura de queijos, manufatura de produtos similares ao queijo e lipólise da manteiga e do creme de leite.

A química orgânica é a aplicação mais importante de lipases após a indústria de alimentos. Além de catalisarem reações de hidrólise regioseletiva, acilação e transesterificação, as lipases catalisam uma crescente variedade de processos enantiosseletivos.

A indústria farmacêutica tem produzido compostos opticamente puros, em detrimento da produção das misturas racêmicas, que por sua vez apresentam uma série de implicações indesejáveis, como ocorrência de vários efeitos colaterais. Muitos fármacos sintetizados possuem um ou mais estereocentros, que são geralmente comercializados como uma mistura racêmica (Jaeger e Eggert, 2002), porém a atividade biológica de um composto depende, em muitos casos, de sua configuração absoluta. Normalmente, um dos isômeros (*R* ou *S*) apresenta atividade biológica, enquanto o outro é menos ativo ou até mesmo tóxico.

Uma forma de obter fármacos ou insumos farmacêuticos em suas formas enantioméricas ativas com elevada pureza enantiomérica é através de enzimas, capazes de reconhecer moléculas quirais e atuarem, preferencialmente, em um dos isômeros de uma mistura racêmica. Um exemplo da utilização da lipase para obtenção do enantiômero puro foi realizado por Carvalho *et al.*, (2005), para a obtenção do enantiômero (*S*)-ibuprofeno, forma 160 vezes mais ativa do que a forma (*R*) (Figura 6).

Este foi obtido a partir da reação de esterificação do racemato ibuprofeno (ácido 2-[4-(2-metilpropil) fenil] propanóico, fórmula molecular $C_{13}H_{18}O_2$). Geralmente, o produto opticamente puro tem um alto valor agregado, maior que a mistura racêmica, entretanto, a produção pode ser limitada por dificuldades legais e do processo.

Além de catalisarem reações de hidrólise regioseletiva, acilação e transesterificação, uma crescente variedade de processos enantiosseletivos por catálise de lipase, alcoóis secundários enantiopuros, foram utilizados como intermediários na síntese de Dorzolamida, uma droga antiglaucoma. Além disso, as lipases são utilizadas nas indústrias para a modificação ou a síntese de antibióticos, anti-inflamatórios compostos, pesticidas (Hasan et al., 2006).

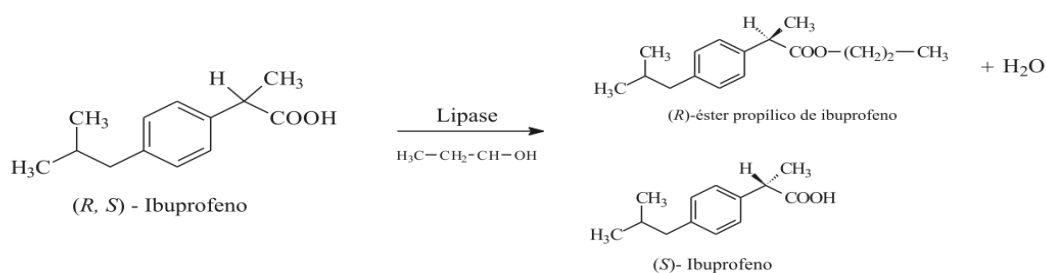


Figura 6: Obtenção do (S)-Ibuprofeno (Carvalho et al., 2005).

Uma aplicação importante das lipases resistentes a altas temperaturas, proteólise e desnaturação por agentes tensioativos, é o seu uso como aditivo para detergentes. Elas facilitam os processos de limpeza, hidrolisando os lipídeos e favorecendo a solubilização destas biomoléculas em água. Em 1994, a primeira lipase utilizada na fabricação de detergente foi introduzida pela Novo Nordisk. Esta lipase, chamada de Lipolasetm, foi produzida pelo fungo *T. lanuginosus* e expresso em *Aspergillus oryzae*. Elas são também utilizadas na síntese de agentes tensioativos para sabonetes e xampus.

A principal vantagem do uso de lipases nos detergentes em substituição aos polissulfatos está na biodegradabilidade e redução dos impactos

ambientais (Hasan et al., 2006). A ação de lipases sobre lipídeos também encontra aplicação no tratamento de efluentes e gestão de resíduos. As lipases podem ser utilizadas para a remoção de óleo presente nas águas residuais de fábricas, restaurantes e residências. Além disso, elas são úteis no tratamento de remoção de biofilme e descontaminação de solos afetados por petróleo (Demarche et al., 2011).

Os óleos vegetais, as gorduras animais e os óleos e gorduras residuais podem ser modificados através da reação de transesterificação visando melhorar características como viscosidade, densidade específica, entre outras, para serem utilizadas para a produção de uma forma alternativa de combustível, o biodiesel. A obtenção do biodiesel ocorre através da reação de transesterificação, onde um óleo reage com um álcool, na presença de um catalisador, como um álcalis, um ácido ou uma enzima (lipase). Podem ser usados óleos de baixo pH além de óleo de cozinha. A vantagem de se utilizar processo enzimático é devido ao bom rendimento obtido, maior seletividade, inexistência de rejeito aquoso alcalino e menor produção de outros contaminantes (Hasan et al., 2006).

Diversas abordagens têm sido utilizadas para encontrar lipases que tenham mais atividade e estabilidade nos meios reacionais utilizados em biotecnologia. Dentre elas destaca-se a prospecção de novas enzimas na biodiversidade microbiana, que envolve técnicas tradicionais de isolamento e cultivo, e técnicas mais modernas, baseadas na metagenômica. Tradicionalmente, a obtenção de novas enzimas tem sido realizada através do isolamento e cultivo de microrganismos, porém, essa técnica apresenta limitações, pois apenas 1% dos microrganismos existentes na biodiversidade são cultiváveis (Handelsman et al., 1998, Rondon et al., 2000, Torsvik e Ovreas, 2002).

A metagenômica pode superar essa limitação, uma vez que o DNA é extraído diretamente de uma amostra ambiental, como solos, rúmen de caprinos, biofilmes, sem a necessidade de isolamento e cultivo, aumentando, portanto, as chances de obtenção de novas e melhores enzimas, com características desejáveis para aplicação biotecnológica.

1.2. Lipases Metagenômicas

A descoberta de novos genes microbianos que codificam enzimas foi por muito tempo dependente do cultivo de microrganismos, através da busca por microrganismos produtores de enzimas. Porém, essa técnica apresenta limitações, pois se sabe que apenas uma pequena proporção (cerca de 1%) destes microrganismos podem ser cultivados em laboratório. Isto se deve basicamente às limitações inerentes às técnicas de isolamento e cultivo, uma vez que todos os meios de cultura são seletivos em maior ou menor extensão para os diversos grupos de microrganismos e, na maioria das vezes, são incapazes de reproduzir as condições encontradas no ambiente. Este é o caso de microrganismos que vivem sob a forma de consórcios, onde uma espécie depende de produtos do metabolismo de outras espécies para sua sobrevivência e multiplicação (Handelsman 2004; Rondon et al., 2000).

O termo metagenômica foi primeiramente usado por Jo Handelsman e atualmente é definido como “a aplicação de técnicas de genômica moderna para o estudo de comunidades de microrganismos diretamente em seus ambientes naturais, sem a necessidade de isolamento e cultivo, em laboratório, das espécies individuais” (Handelsman et al., 1998).

A técnica da metagenômica consiste na seleção e coleta de amostras do ambiente, na extração dos fragmentos de DNA e posterior sequenciamento e análise; em seguida, por técnicas de engenharia genética, os fragmentos de DNA extraídos são selecionados e unidos a outros fragmentos de DNA, denominados vetores de clonagem, formando uma molécula de DNA circular, com capacidade independente de replicação, denominada DNA recombinante; e finalmente, essas moléculas de DNA são inseridas em uma bactéria hospedeira cultivável em laboratório originando uma coleção de clones denominada biblioteca metagenômica. A prospecção das bibliotecas metagenômicas pode ser realizada de três formas: prospecção funcional, prospecção baseada na sequência e a prospecção baseada na expressão gênica induzida pelo substrato (Uchiyama e Watanabe, 2008). A prospecção funcional é uma técnica com a qual as colônias são selecionadas com base em uma atividade, como degradação de lipídeos, proteínas, atividade

antimicrobiana, resistência a antibióticos. Com a prospecção baseada na sequência se busca uma sequência codificadora da proteína de interesse, tudo aliado aos importantes avanços da bioinformática e das novas tecnologias de sequenciamento (Jones, 2010). A prospecção baseada na expressão gênica induzida pelo substrato – SIGEX (“substrate-induced gene expression”), e uma técnica desenvolvida para detecção de atividade catabólica em bibliotecas metagenômicas. É utilizado um vetor que permite a clonagem do DNA metagenômico ao gene da proteína GFP (*green fluorescent protein*), sem promotor. Assim, a GFP é expressa quando o gene clonado é induzido pelo substrato correspondente e os clones positivos são identificados por emissão de fluorescência (Uchiyama e Watanabe, 2008). A Figura 7 apresenta estratégias de pesquisa para acessar novos biocatalisadores com a abordagem metagenômica.

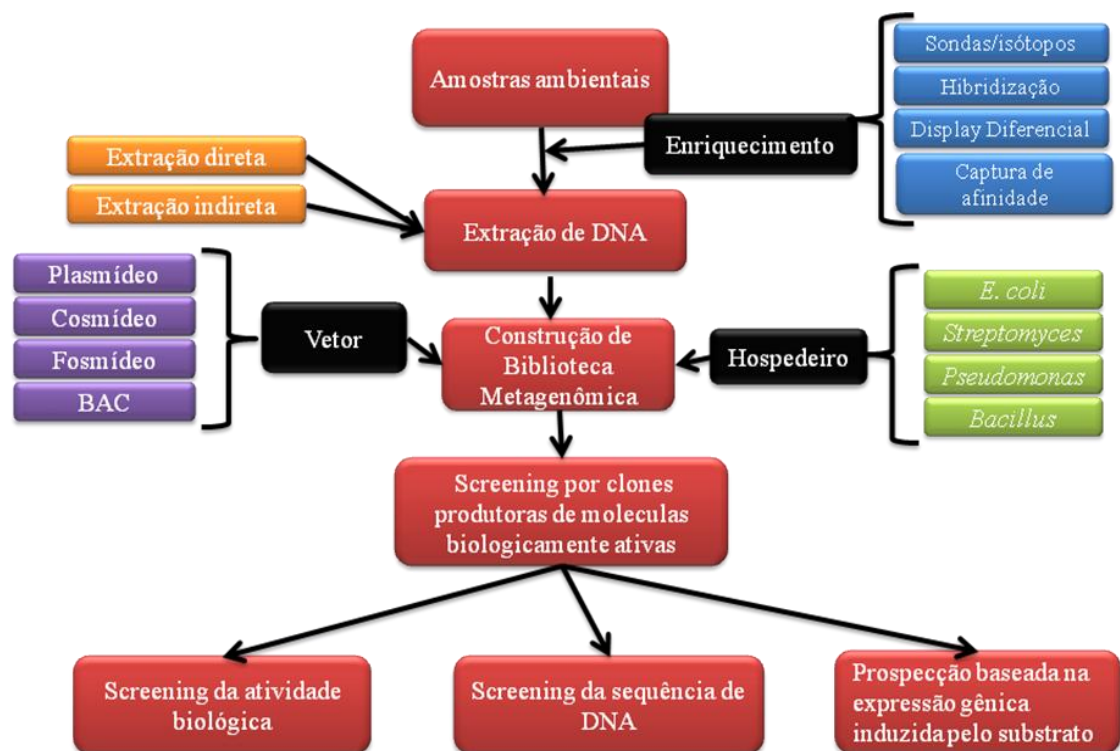


Figura 7: Esquema da abordagem metagenômica com estratégias de pesquisa para acessar novos biocatalisadores (Adaptada de Xing et al., 2012).

A metagenômica tem encontrado cada vez mais novas lipases para muitas aplicações industriais por apresentarem alta estabilidade em elevadas temperaturas, em solventes orgânicos e em agentes tensoativos. Estudos de metagenômica permitiram a identificação de uma esterase para a preparação de (S)-cetoprofeno (Carvalho *et al.*, 2005).

Embora diversos métodos, tais como a cristalização, a resolução cinética e a separação cromatográfica sejam relatados para a preparação de (S)-cetoprofeno, prefere-se a aplicação de enzimas tais como esterases/lipases em comparação a catalisadores químicos, porque estas apresentam uma alta enantiosseletividade, evitando reações e produtos colaterais. Portanto, encontrar novas esterases ou lipases enantiosseletivas, como por exemplo, para obtenção de (S)-cetoprofeno, enfatiza a importância de bibliotecas metagenômicas como recurso potencial para identificar genes desconhecidos e de elevadas especificidades (Yoon *et al.*, 2007).

Os genes de lipases descobertos a partir de bibliotecas metagenômicas podem ser oriundos de vários ambientes, como por exemplo, lama e sedimentos, em água, de ambientes térmicos (Rhee *et al.*, 2005), solos contaminados por gordura (Glogauer *et al.*, 2011; Elend *et al.*, 2007; Elend *et al.*, 2006), solos de compostagem (Lammle *et al.*, 2007), sedimentos marinhos (Jeon *et al.*, 2009a), sedimentos do ártico (Jeon *et al.*, 2009b), solos lixiviados (Rashamuse *et al.*, 2009) e solos de diferentes ecossistemas (Faoro *et al.*, 2011; Couto *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2009). A Tabela 3 apresenta algumas das publicações relacionadas com prospecção metagenômica de enzimas lipolíticas.

Tabela 3. Enzimas lipolíticas identificadas a partir de bibliotecas metagenômicas

Clones lipolíticos positivos/Total Clones	Ambiente	Referência
5/7.000	Bacias hipersalinas	Ferrer <i>et al.</i> , (2005a)
12/14.000	Rúmen de bovino	Ferrer <i>et al.</i> , (2005b)
1/60.000	Solo de floresta, praia, lama	Kim <i>et al.</i> (2006)
11/30.000	Água de lagoa	Rajan <i>et al.</i> , (2005)
4/1.016.000	Solo	Henne <i>et al.</i> , (2000)
2/3.648	Solo	Rondon <i>et al.</i> , (2000)
1/2.500 e 1/1.600	Solo contaminado e água	Elend <i>et al.</i> , (2006)
70/7.000	Sedimento do Mar Báltico	Hardeman e Sjöling (2006)
8/33.700	Solo de mata	Lee <i>et al.</i> , (2004)
4/386.400	Sedimento marinho	Lee <i>et al.</i> , (2006)
10/10.000	Biomassa	Meilleur <i>et al.</i> , (2009)
2/800	Solo	Wei <i>et al.</i> , (2009)
3/40.000	Lago	Rees <i>et al.</i> , (2003)
6/93.000	Solo	Li <i>et al.</i> , (2008)
4/2.000	Fontes termais	Rhee <i>et al.</i> , (2005)
2/1.532	Solo de campo	Voget <i>et al.</i> , (2003)
1/8.000	Água de rio	Wu e Sun (2009)
2/36.000	Solo – Hot Spring	Tirawongsaroj <i>et al.</i> , (2008)
6/60.132	Sedimento marinho	Jeon <i>et al.</i> , (2009)
14/21.000	Solo de jardim	Lämmle <i>et al.</i> , (2007)
1/100.000	Lodo – estação de esgoto	Roh e Villatte (2008)
18/15.360	Rúmen de bovino	Liu <i>et al.</i> , (2009)
12/3.818	Lodo ativo	Liaw <i>et al.</i> , (2010)
19/23.400	Adubo orgânico	Kim <i>et al.</i> , (2010)
19/40.000	Sedimento marinho	Hu <i>et al.</i> , (2010)
100.128/315	Solo	Faoro (2010)

1.3. Uso das lipases metagenômicas como biocatalisadores na produção de biodiesel

A escassez global de combustíveis fósseis e o aumento significativo do preço do petróleo aumentaram as preocupações ambientais referentes ao uso de fontes energéticas não renováveis. Assim, cria-se a necessidade de se desenvolver fontes renováveis de energia para a gradual substituição dos combustíveis derivados do petróleo, pois, além destes serem fontes esgotáveis, apresentam um significativo impacto negativo na qualidade do meio ambiente e possuem elevada capacidade de gerar resíduos tóxicos.

Esse fato estimulou o rápido crescimento na produção de biodiesel. O biodiesel é geralmente produzido através da reação de transesterificação química ou enzimática. Transesterificação enzimática é de elevado interesse, pois este processo apresenta algumas vantagens em relação à catálise química da transesterificação e é mais "verde".

1.3.1. Matriz Energética e Mercado de Combustíveis no Brasil

Como política e estratégia energética, o Brasil procura diversificar as fontes de energia, buscando fortalecer a participação de fontes renováveis no abastecimento do mercado interno, como forma de prover segurança energética de forma sustentável. A matriz energética brasileira está representada na Figura 8.

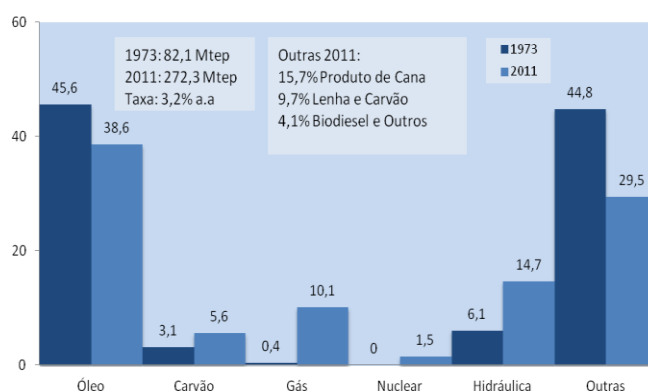


Figura 8. Matriz energética brasileira (MME, 2013)

Conforme é possível perceber da leitura da figura 8, existe uma significativa migração energética para fontes renováveis de energia. Desde 1973, a participação de óleo diminuiu sensivelmente *vis a vis* o aumento de participação de matriz de carvão, nuclear e hidráulica.

Além disso, também é possível perceber que o biodiesel registrou uma elevada participação, comparável à de utilização de carvão e superior à matriz nuclear.

1.3.2. Programa Brasileiro de Biodiesel: diretrizes e marco regulatório

O Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) foi lançado em 6 de dezembro de 2004. Para tanto, foram necessários diversos estudos, providências e medidas visando a acolher, no marco legal e regulatório brasileiro relacionado aos combustíveis, o biodiesel como novo integrante.

A definição do modelo tributário, o mecanismo denominado Selo Combustível Social, a criação de linhas de financiamento, as ações promotoras do desenvolvimento tecnológico e o estímulo à formação do mercado nacional para o biodiesel, por meio dos leilões de compra conduzidos pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) constituem os pontos centrais do PNPB.

Além disso, o PNPB contém importantes diretrizes, que tem como objetivo nortear a sua execução. Por exemplo, encontra-se definido como diretriz a introdução do biodiesel na matriz energética nacional de forma sustentável, permitindo a diversificação das fontes de energia, o crescimento da participação das fontes renováveis, a segurança energética e a diminuição das emissões de poluentes e dos gastos relacionados ao combate aos chamados males da poluição, especialmente nos grandes centros urbanos.

A necessidade de geração de emprego e renda, especialmente no campo, para a agricultura familiar, na produção de matérias-primas oleaginosas, bem como a redução de disparidades regionais, permitindo o desenvolvimento das regiões mais carentes do País: Norte, Nordeste e Semi-Árido também são diretrizes do Programa.

Também são consideradas como diretrizes do programa o estímulo à economia de divisas, com a redução de improtações de diesel; a concessão de incentivos fiscais e implementação de políticas públicas direcionadas a regiões e produtores carentes, propiciando financiamento e assistência técnica e conferindo sustentabilidade econômica, social e ambiental à produção do biodiesel; e a regulamentação flexível, permitindo uso de distintas matérias-primas oleaginosas e rotas tecnológicas (transesterificação etílica, metílica ou enzimática, craqueamento, etc.).

Implícita nessa listagem de diretrizes está a convicção sobre a viabilidade de se atingir objetivos econômicos, sociais, ambientais e estratégicos com a cadeia produtiva do biodiesel, uma vez que a demanda por fontes de energia renovável é crescente no Brasil e no mundo, e o país tem plenas condições de atender parte significativa dessa demanda (MME,2013).

Os benefícios da utilização do biodiesel tornam-se mais expressivos, quando se sabe que a poluição na cidade de São Paulo, mata mais de 7 mil pessoas por ano. Na Conferencia de Biodiesel em 2012 foram divulgados dados de uma pesquisa realizada pelo Laboratório de Poluição da USP pelo Dr Paulo Saldiva e mais seis universidades federais revelando que são gastos 459,2 milhões de reais anuais para tratar doenças respiratórias provocadas por poluentes da fumaça de óleo diesel (partícula fina). Esse gasto é feito por unidades públicas e privadas de saúde nas regiões metropolitanas do País: São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Porto Alegre, Curitiba e Recife. Segundo o estudo, 8.169 pessoas são internadas anualmente com problemas cardíacos causados por partícula fina. São Paulo lidera o ranking das cidades pesquisadas,registrando 7.817 mortes por ano e 335 milhões de reais com gastos com internação.

Considerando a extensão territorial do Brasil, a variedade de clima e solo e a existência de diversificadas opções de matérias-primas oleaginosas como a palma (dendê), a mamona, a soja, o algodão, o amendoim, o pinhão manso (*Jatropha curcas L.*), o girassol, gorduras animais e óleos residuais, dentre outras, o Brasil optou por não privilegiar qualquer matéria-prima oleaginosa ou rota tecnológica, deixando a escolha para o produtor, com base em sua análise de custos de produção e de oportunidade (Bergmann et al., 2013).

O biodiesel pode ser constituído por ésteres sintetizados por meio de reações de esterificação ou transesterificação.

A produção do biodiesel por transesterificação é realizada a partir de um triacilglicerol e um álcool (Park *et al.*, 2008). Nos processos industriais desenvolvidos atualmente, o catalisador é de origem química. O co-produto glicerol formado na reação pode ser recuperado e purificado, e tem amplas aplicações.

Os triacilgliceróis necessários para a produção do biodiesel podem ser provenientes de diversas fontes, como óleos vegetais refinados, brutos ou utilizados em fritura, gordura animal e óleo de microalgas. Óleos com diferentes composições em ácidos graxos influenciam na qualidade do biodiesel produzido. A figura 9 mostra as etapas da produção de biodiesel.

O biodiesel produzido a partir de óleos com alto teor de ácidos graxos insaturados são menos viscosos e solidificam a temperaturas mais baixas, o que torna esse biodiesel mais adequado para utilização em temperaturas baixas. Para tanto, a utilização de lipases estáveis de origem microbiana como catalisador na reação de síntese do biodiesel (Fukuda, Kondo et al., 2001).

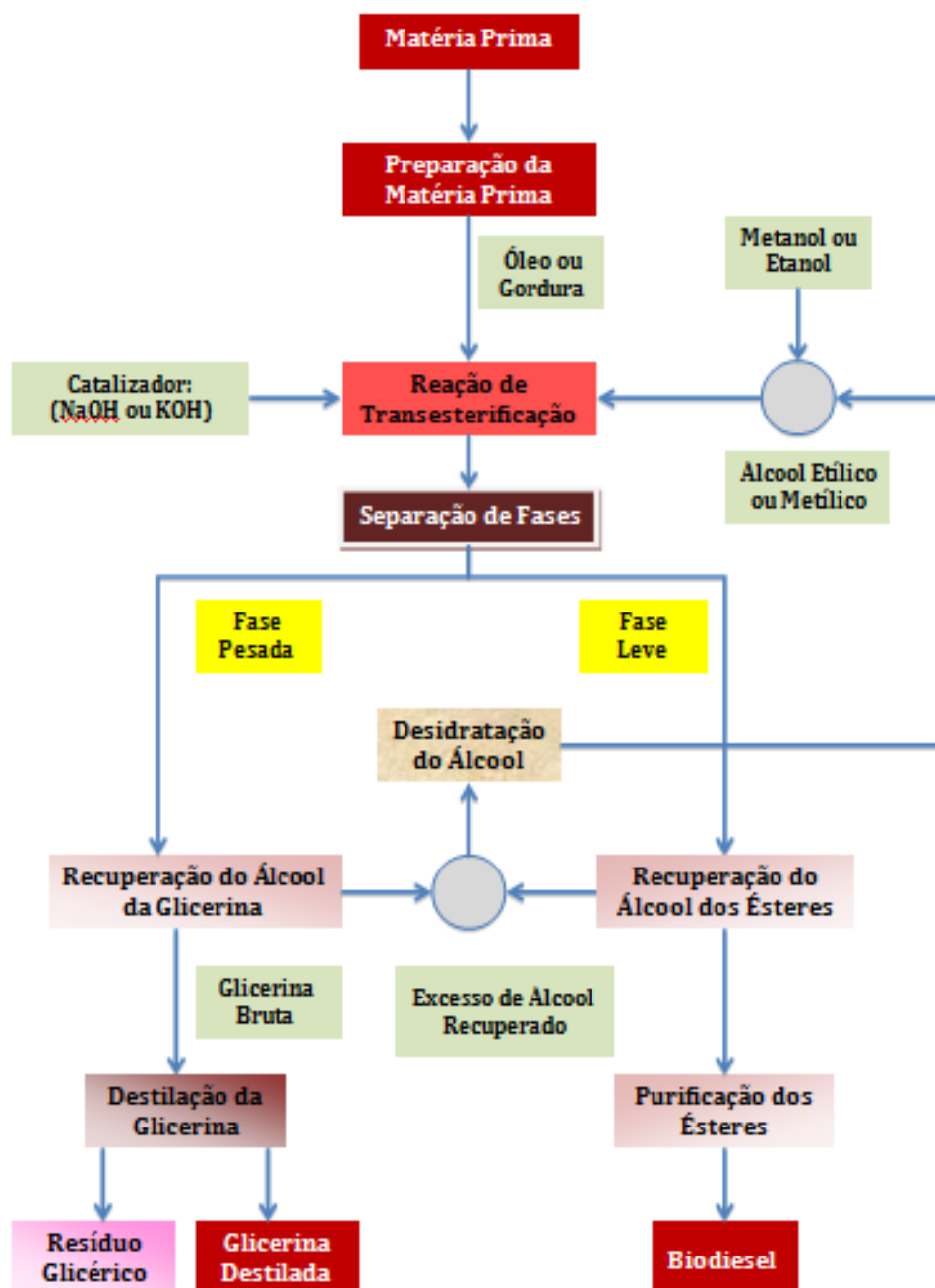


Figura 9. Processo de Produção de Biodiesel (Adaptado de Parente et al.,2003).

Os catalisadores enzimáticos oferecem vantagens e desvantagens (Tabela 4) frente aos catalisadores químicos, como a menor sensibilidade à presença de água (não formam sabões), recuperação do catalisador e separação do biodiesel. No entanto, diversos estudos apontam que a enzima imobilizada em um suporte adequado é sempre mais ativa que a livre em condições reacionais comparáveis. Isto devido à maior eficácia do sistema heterogêneo diante da maior disponibilidade dos sítios ativos das enzimas quando confinadas nos poros do sólido, uma vez que em sistema homogêneo ocorre a formação de agregados, ficando os sítios não disponíveis no interior dos mesmos (De Castro et al., 2004, Ha et al., 2007). Além disso, é uma alternativa que reduz o impacto ambiental pela minimização dos resíduos gerados no processo.

Tabela 4. Principais vantagens e desvantagens do uso de um catalisador químico ou enzimático

Processos	Vantagens	Desvantagens
Químicos	<ul style="list-style-type: none"> •Simplicidade •Alto rendimento •Curto tempo de reação 	<ul style="list-style-type: none"> •Dificuldade de separação do catalisador •Impossibilidade da reutilização do catalisador •Obtenção de produtos com menor grau de pureza •Necessidade de tratamento de água após a transesterificação
Enzimático	<ul style="list-style-type: none"> •Facilidade da separação do catalisador •Obtenção de produtos com maior grau de pureza •Menor temperatura de reações •Fácil recuperação do glicerol •Bons rendimentos e alta seletividade 	<ul style="list-style-type: none"> •Longo tempo de reação •Custo das enzimas

Recentemente, a aplicação de lipases na geração limpa de energia, através da transesterificação enzimática para produção de biodiesel a partir de óleos vegetais brutos, tem atraído a atenção das indústrias e pesquisadores devido à possibilidade de produzir um produto de alta pureza e à facilidade de separação do glicerol.

Neste contexto, este projeto propõe a procura de enzimas hidrolíticas de interesse para indústria de biocombustíveis através de uma abordagem metagenômica.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Caracterização molecular de 3 novas lipases obtidas por prospecção metagenômica de solo de Cerrado.

2.2. Objetivos Específicos

- Confirmar dos fenótipos lipolíticos dos clones metagenômicas isoladas anteriormente;
- Sequenciar os clones metagenômicos com atividade lipolítica;
- Analisar as ORFs identificadas nos clones metagenômicos;
- Caracterizar das ORFs por análise de similaridade;
- Identificar a sequência de nucleotídeos e, conseqüentemente, a sequência de aminoácidos da proteína;
- Realizar amplificação e clonagem em vetores de expressão do gene identificado;
- Realizar a expressão heteróloga do clone e purificar a proteína expressa por este clone.

3. Material e métodos

3.1. Amostra

A biblioteca metagenômica utilizada neste trabalho foi previamente construída com um *pool* de amostras coletadas aleatoriamente em cinco diferentes pontos de uma área de Cerrado *Stricto Sensu*, localizada na reserva ecológica do IBGE no Distrito Federal (Castro, 2008). Foi construída em *Escherichia coli* EPI300-T1 (*Epicentre Biotechnologies*, EUA) com o vetor pCF430 (Figura 10) utilizado para a biblioteca de pequenos insertos – que têm tamanho mediano de 8 Kb (Castro, 2008)

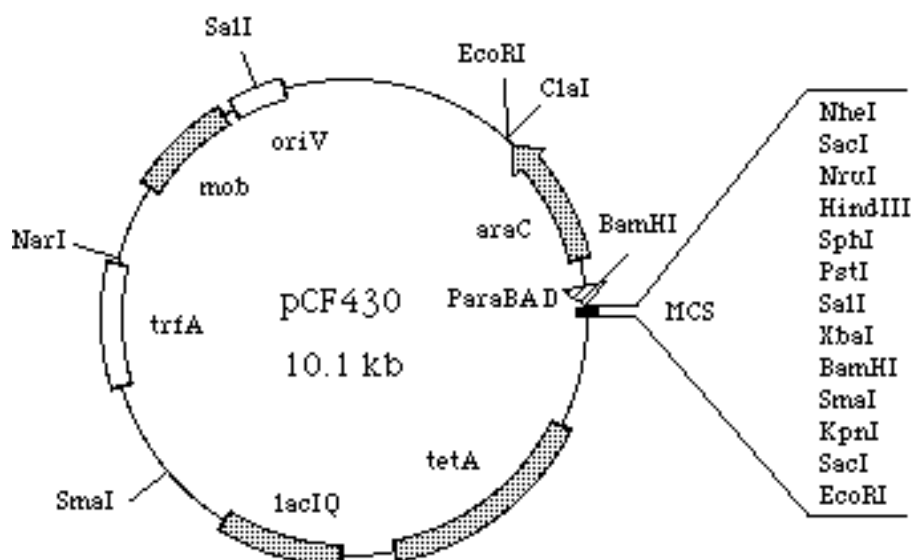


Figura 10. Mapa do vetor de clonagem pCF430 utilizado na construção da biblioteca de pequenos insertos. Observa-se os sítios de restrição e de clonagem (MCS), o gene de seleção antibiótica (tetA). Disponível em(<http://gillnet.lab.nig.ac.jp/~cvector/map/pCF430.gif>)

3.2. Triagem funcional para enzimas lipolíticas

A seleção de clones metagenômicos produtores de lipases foi realizada por Albuquerque (2010) em meio de cultura sólido (LB-ágar), conforme descrito por Lee *et al.* (2004). Para tanto, os clones da biblioteca metagenômica foram inoculados neste meio de cultura contendo 1% de tributirina, 40 µg/ml de tetraciclina e 0,02% de arabinose e também com 1% óleo de dendê e rodamina. As culturas foram incubadas a 37°C por 16 horas, e posteriormente à temperatura ambiente, sendo analisadas a cada 24 horas até 5 dias de cultivo, para visualização dos halos de hidrólise em torno das colônias produtoras de lipases. As colônias que apresentaram o halo de hidrólise do substrato tributirina e com óleo de dendê foram coletadas e novamente plaqueadas em meio seletivo. Este procedimento foi repetido por três vezes para a confirmação da atividade dos clones selecionados. Três clones denominados Clone X, Clone Y e Clone W foram confirmados como produtores de atividade lipolítica.

3.3. Extração de DNA plasmidial e análise do perfil de restrição

Para a extração do DNA plasmidial dos clones com atividade lipolítica foram cultivados em 250 mL de meio LB (g.L⁻¹: bactotripton 10 g, extrato de levedura 5 g, NaCl 10 g – pH 7,0) contendo tetraciclina (40 µg/mL), a 37°C e 240 rpm. Após 18 horas de cultivo as culturas foram centrifugadas a 5000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 20 mL da solução STE gelada (NaCl 0,1M, Tris-HCl 10mM – pH 8,0, EDTA 1mM – pH 8,0), centrifugadas mais uma vez, nas mesmas condições.

O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 5 mL de solução I gelada (Glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM – pH 8,0, EDTA 10 mM – pH 8,0) contendo 0,5 mL de lisozima (10 mg/mL) e incubadas no gelo por 10 minutos. Em seguida adicionou-se 10 mL da solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1%), e esta amostra foi incubada à temperatura ambiente por 5 a 10 minutos.

Decorrido esse tempo foram adicionados à amostra 7,5 mL da solução III gelada (acetato de potássio 3M, ácido acético 2M – pH 4,8-5,0).

Esta amostra foi centrifugada a 12.000 g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para outro tubo. Ao sobrenadante foram adicionados 1 mL de isopropanol para precipitar o DNA plasmidial, esta etapa foi realizada à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida foi realizada uma nova centrifugação nas mesmas condições descritas acima, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% e secado. O precipitado foi ressuspensionado em 3 mL de tampão TE (Tris-HCl 20 mM – pH 8,0, EDTA 20 mM) e adicionado de 3 mL de LiCl 5M previamente resfriado, misturando bem e centrifugando a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e acrescido de igual volume de isopropanol, misturando bem e centrifugando nas mesmas condições.

O precipitado foi lavado uma vez com etanol 70% e deixado secar, então ressuspensionado em 500 µL de tampão TE contendo RNaseA na concentração final de 20 µg/mL. A solução foi transferida para um microtubo e incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. Foram adicionados a esta mistura 500 µL de uma solução de NaCl 1,6M contendo 13% de polietileno glicol (PEG), e esta foi incubada por 30 minutos a 4°C, sendo em seguida centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi então removido com a pipeta e o precipitado ressuspensionado em 400 µL de tampão TE. A solução foi extraída três vezes com fenol equilibrado – pH 8,0, outra com clorofil (24 clorofórmio: 1 álcool isoamílico). A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e a ela adicionou-se 100 µL de acetato de amônio 10M.

Em seguida foram adicionados dois volumes de etanol 100%, esta mistura foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Depois de centrifugar a 12.000 g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o precipitado lavado duas vezes com etanol 70%. Após secar o precipitado foi ressuspensionado em 500 µL de tampão TR (Tris-HCl 10 mM – pH 7,5, EDTA 1 mM) e estocado a -20°C até sua utilização como fonte de DNA.

Para análise da presença de inserto, fragmentos com tamanho esperado de 6 a 10 kb, o DNA extraído dos clones X, Y e W foi digerido com a enzima de

restrição *Pst* I (10 U/ μ L - Promega, Madison, WI, EUA) por 16 horas a 37°C. O sistema de digestão foi realizado da seguinte maneira: 5 μ L de DNA (4 μ g), 1 μ L BSA 10X, 1 μ L de tampão H (promega), 1 μ L de enzima *Pst* I (10 U) e 2 μ L de água MilliQ em um volume final de 10 μ L. Após 16 horas de reação a enzima *Pst* I foi inativada à 65°C por 15 minutos e o DNA digerido submetido a eletroforese em gel de agarose a 0,8%, com voltagem contínua de 96V.

Para visualização do DNA, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo, descorado em água destilada e irradiado com luz ultravioleta. Os três clones com atividade lipolítica, X, Y e W, apresentaram fragmentos de restrição de tamanho esperado entre 6 a 10 kb.

3.4. Confirmação do fenótipo e da atividade lipolítica

O DNA plasmidial (0,8 μ g/ μ L) dos clones X, Y e W extraídos como descrito no item 3.3, foi utilizado na transformação de células de *E. coli* (EPI-300) por eletroporação utilizando o aparelho: eletroporador Gene Pulsed® (Biorad). A eletroporação foi realizada nas seguintes condições: capacitância 25 μ F; resistência de 200 - 700 Ω ; voltagem 1.8 KV. Após o procedimento de eletroporação, foi adicionado às células 1 mL de meio de cultura SOC (g.L⁻¹: 20 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 0,5 g de NaCl, KCl a 250 mM - pH 7,0, acrescido de MgCl₂ 2 M e glicose 20 mM). Esta cultura foi incubada por uma hora a 37°C, e as células, posteriormente, plaqueadas em meio LB-ágar contendo 40 μ g/mL de tetraciclina, tributirina a 1% e arabinose a 0,01%. Estas placas foram incubadas durante a noite a 37°C e após esse período foram deixadas em temperatura ambiente e analisadas a cada 24 horas até 5 dias de cultivo para detecção da atividade lipolítica.

Os clones recombinantes foram selecionados pelo crescimento neste meio de cultura e pela capacidade de degradar tributirina, evidenciada pela formação de halos de hidrólise em torno das colônias. Os clones recombinantes foram plaqueados novamente em outra placa contendo o meio de cultura seletivo, este procedimento foi repetido mais uma vez visando a confirmação da atividade lipolítica dos clones selecionados.

3.5. Vetor de expressão pET21a(+)

Existem diversas opções de vetores a serem utilizados para expressão induzida de proteínas recombinantes em *E. coli*. Foi utilizado um vetor pET (Plasmid for expression by T7 RNA Polimerase), cuja expressão está sob o controle do promotor de transcrição bacteriófago T7 que é reprimido pela região operadora *lac* onde se liga o repressor *lac*. Para a utilização deste vetor é preciso transformá-lo em uma célula que possua o gene da T7 polimerase no cromossomo, como é o caso da *E. coli* BL21 (DE3).

O vetor pET21a(+) (Novagen®) foi utilizado para expressão da proteína em *E. coli*, sendo a indução da expressão feita por IPTG. Este vetor contém o promotor T7, terminador T7, múltiplo sítio de clonagem, sequência que codifica uma cauda N-terminal contendo 6 histidinas (6xHisTag), sendo resistente à ampicilina (AmpR).

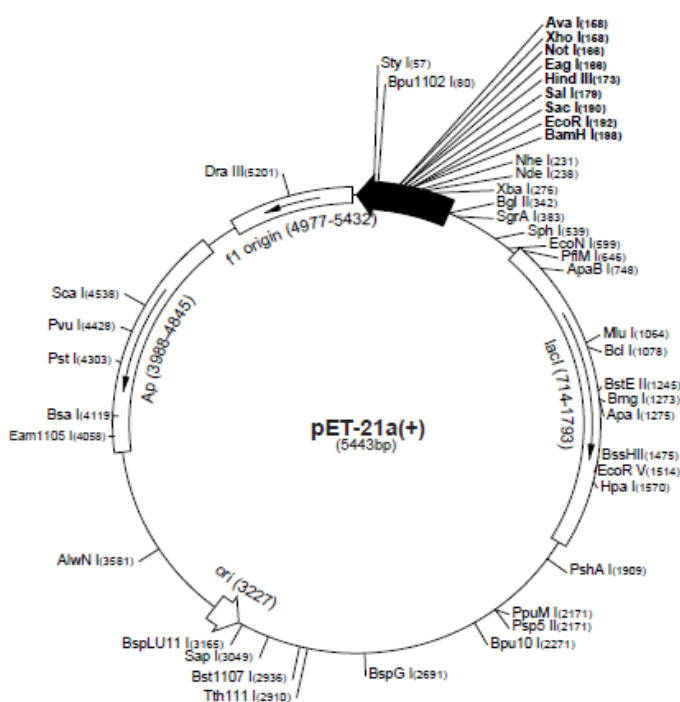


Figura 11. Mapa físico do vetor de expressão pET-21a(+), o vetor contém o promotor T7, terminador T7, múltiplo sítio de clonagem, sequência que codifica uma cauda N-terminal contendo 6 histidinas (6xHisTag), sendo resistente à ampicilina (AmpR).

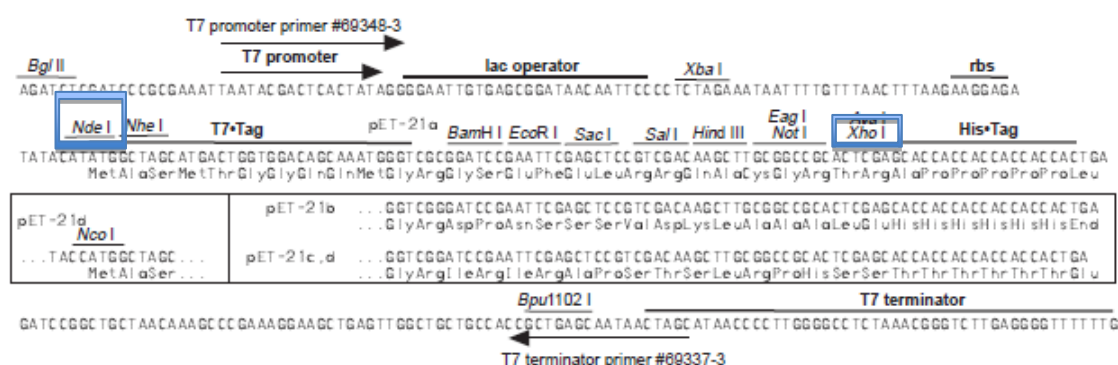


Figura 12. Região de múltipla clonagem do vetor pET-21a(+). O gene foi clonado entre os sítios de *NdeI* e *XhoI* (Promega, EUA) do vetor pET21a(+).

3.6. Preparo de células eletrocompetentes

As células eletrocompetentes utilizadas foram da cepa de *E. coli* EPI300 e da cepa BL21 DE3. Foram inoculadas em 5 mL de meio LB sob agitação (240 rpm) a 37°C, por 16 horas.

Após, foram inoculados os 5 mL em 500 mL de meio SOB e cultivados sob agitação (240 rpm) a 37°C, até atingir Abs 600=0,5. As células foram então transferidas para tubos previamente resfriados e centrifugadas a 7000 g por 10 minutos a 2°C.

O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano ressuspenso em 5 mL de glicerol 15% estéril, atentando-se para o fato de que as células deveriam ser mantidas sempre no gelo até o final do processo.

Depois de ressuspenso, as células foram novamente centrifugadas (7000 g por 10 minutos a 2°C), o sobrenadante novamente descartado e a lavagem com glicerol 10% estéril repetida. As células foram novamente centrifugadas e o sedimento ressuspenso em 2 mL de glicerol 10% estéril. Estas foram então divididas em alíquotas de 50 µL, e congeladas a -80°C. A eficiência da transformação das células foi estimada em 10⁸ transformantes por µg de DNA para a cepa EPI300 e de 10⁶ para a cepa BL21DE3.

3.7. Sequenciamento

Os clones foram sequenciados na empresa Macrogen Inc. (Seoul, na Coréia do Sul). Atendeu-se aos requisitos mínimos de concentração dos vetores a 200 ng/ μ L e 5 μ L de DNA por reação. Os vetores dos clones selecionados foram extraídos por reação de maxiprep utilizando o kit QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, EUA). Utilizou-se inóculo inicial de 500 mL em meio LB para cada clone, adicionado do antibiótico de seleção. Ao final da reação, os vetores foram quantificados no fluorômetro Qubit (Invitrogen, EUA).

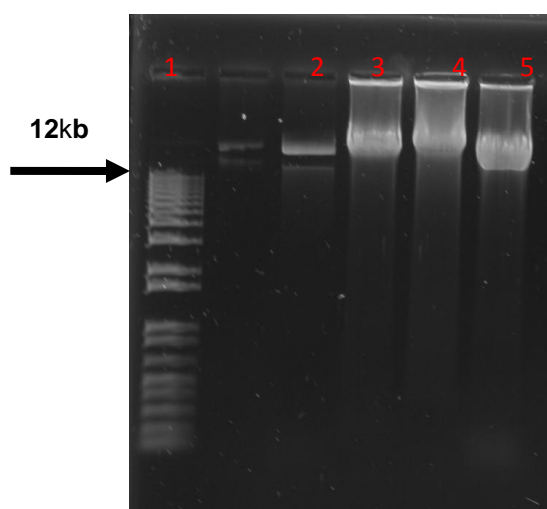


Figura 13. Maxiprep dos clones para sequenciamento: 1) 1kb plus; 2) miniprep do Clone X; 3) Max prep de Clone X; 4) Max Prep de Clone Y; 5) Max Prep de Clone W.

O sequenciamento foi feito por “primer walking” e as sequências editadas utilizando como corte o valor 30 do algoritmo PHRED. As sequências, ou parte delas, com valores menores que este foram descartadas. Os contigs foram montados no programa BioEdit (Hall, 2007) e os oligonucleotídeos construídos no programa Primer3Plus disponível em (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>, (Untergasser et al., 2007).

A análise dos oligonucleotídeos, quanto à presença de homodímeros e grampos (hairpins), foi realizada no programa OligoAnalyser disponível no site

da empresa Integrated DNA Technologies (IDTDNA) disponível em (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>).

Os oligonucleotídeos adequados apresentam valores mínimos de ΔG . Para análises de grampings, o valor mínimo de ΔG tolerado para a extremidade 3' é de -2 kcal/mol e para o interior é de -3 kcal/mol. Para análise dos homodímeros, o valor mínimo de ΔG tolerado para a extremidade 3' é de -5 kcal/mol e para o interior do primer é de -6 kcal/mol. Eles também foram padronizados para tamanho, temperatura de anelamento e conteúdo GC. Para esses parâmetros, foi estabelecido que cada oligonucleotídeo deve ter entre 18 e 22 bp, temperatura de anelamento entre 55 e 60 °C e conteúdo GC entre 50 e 65%. As sequências de todos os oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento estão discriminadas na Tabela 5.

Tabela 5. Oligonucleotídeos construídos para o sequenciamento dos clones X e Y para as extremidades do vetor PCF430.

PCF430			
Forward		Reverse	
pCF430	5' CTCTTTCTCCATACCCGTT 3'	5' TGCAAGGCGATTAAGTTGG 3'	
CLONE Y			
Forward		Reverse	
P1	5' TTTCTGTTTAGCCGGCAACT 3'	5' TCGTATTCTTTGCGCTTCCT 3'	
P2	5' GCGGAAGGGAATCTAATGAC 3'	5' AGGTTTTGTTACCCGCTACG 3'	
P3	5' AATCTAATGACCGCGACAG 3'	5' AACGCCCAGTCAAACAAATC 3'	
P4	5' GGAGCAAGTGCGATTCAGTT 3'	5' AGACTGAAGGGCGCAGTG 3'	
CLONE X			
Forward		Reverse	
P1	5' AATTTACCAACCGAGCCAAA 3'	5' TCAACGCTATCGCTCACATC 3'	
P2	5' AAGGCGCGTTGTGTAATACC 3'	5' CGCGTGTAAGTAACGCTTGA 3'	
P3	5' GACTGGCGCAAGCTGATG 3'	5' GAAGGCCACAACCTCCGATT 3'	
P4	5' AAGCGGCTCTCTACATCCAG 3'	5' GTGGGAATTCCAGATCTTCG 3'	
P5	5' GGCGGGGAAATTTCTCTCTA 3'	5' CGGATCACTGCTTTTGTGG 3'	
P6	5' AAAATCTTTGCCCACCTCTG 3'	5' CTCGAATCTCGCGGCACT 3'	
P7	5' GCGCCAGAACCATTCTC 3'	5' TTTGATCAAGCGCAAATTGA 3'	
P8	5' ACGGATTATGGACGCAGCTT 3'	5' TTTTGTGCTGACGATGCAAT 3'	
P9	5' GCAGGAAGTACCAGCCAAGA 3'	5' GAACCAGGCCGTGCAGAC 3'	
P10	5' TTGCGACCAAGTTCGGACA 3'		
P11	5' GCGCGCAAACCTTCATCT 3'		
P12	5' GGGATTGAATTTACCGAAT 3'		
P13	5' AATTCAATTCGGCTTTCACG 3'		
P14	5' GGGAAATTTGCTCTGAATGC 3'		

3.7.1. Análise das sequências

De forma simplificada, para cada gene, a determinação da função sugerida foi feita por correspondência ao banco de dados não-redundante do National Center of Biotechnological Information (NCBI), utilizando-se o programa “ORF Finder” e o Blast. Os genes identificados serão comparados com genomas de referência e alinhados no programa ClustalW2 (Larkin, Blackshields et al., 2007). Os dendogramas filogenéticos foram construídos no programa MEGA 5.0 (Tamura, Peterson et al., 2011) utilizando o modelo de distância p. O valor de reamostragem (bootstrap) foi de 1000 repetições.

3.7.2. Desenho de primers e reação em cadeia da polimerase PCR da região específica

Primers específicos que flanqueiam a região do genoma referente as lipases foram desenhados com adição de sítios de restrição das enzimas *Xho*I (CTCGAG) e *Nde*I (CATATG), para permitir sua posterior ligação ao vetor de escolha pET-21a(+).

Para o desenho do primer *forward*, foram observados:

1. Os sítios de ligação para a enzima *Nde*I no vetor: **Enzima *Nde*I**

VETOR pET-21a(+) 5' **ACATATGGC**3'
3'TGTATACCG5'

2. Região de ligação da sequência do clone no vetor, com adição do sítio de restrição para a enzima *Nde*I em:

Enzima *Nde*I Lipases
5' **ACATATGLipases**3'
3'TGTATAC...5'
VETOR pET-21a(+)

3. Para tanto, o primer deve possuir a região que flanqueia a porção do genoma referente à lipase deve conter o sítio de restrição para a enzima *Nde* I:

TTTACATATG
AAATGTATAC

Para o desenho do primer *reverse*, foram observados:

1. Os sítios de ligação para a enzima *Xh* *ol* no vetor: **Enzima *Xh* *ol***

VETOR pET-21a(+) 5'CACTCGAGCACCACC3'
3'GTGAGCTCGTGGTGG5'

2. Região de ligação da sequência do clone no vetor, com adição do sítio de restrição para a enzima *Xh* *ol* em lipase e cauda N-terminal de histidina (*His+Tag*), tendo em vista proceder a purificação da proteína:

Enzima *Xh* *ol* His+Tag Códon de terminação
LipaseCTCGAGCACCACCACCACCACCTGA
GAGCTCGTGGTGGTGGTGGTGGTGACT
Sequência complementar

3. O primer deve possuir a sequência complementar da região que flanqueia a porção do genoma referente à lipase, para promover o anelamento e amplificação no sentido 3' – 5' do gene pretendido. Deve conter a sequência complementar ao sítio de restrição para a enzima *Xh* *ol*:

5'GATTATTTCCGTCGA 3' **Lipase**
3'CTAATAAAGGCAGCTGAGCTCAGAC
Sequência complementar da Lipase + Sítio da enzima *Xh* *ol*

Sítio da enzima *Xh* *ol*

5'CAGACTCGAG3'
3'GTCTGAGCTC5'
Sequência nucleotídica anterior ao sítio de *Xh* *ol* no vetor pET-21a(+)

Tabela 6. Desenho de primers que flanqueiam a região do genoma referente as lípases dos Clones X, Clone Y e Clone W.

Lipase	Primer forward	Primer reverse
<i>LipX_orfX</i>	5'TTTACATATG ACCCCGCAGAGCGCCGCGAT 3'	5'CAGACTCGAG GGCGCCCGTGCAGCAGGGC 3'
<i>LipY_orfG</i>	5' TTTACATATG CGATTCTCTCTCAAGTTGAAA 3	5' CAGACTCGAG ACCAGCATTTGTTGAGGAAAC 3'
<i>LipY_orfY</i>	5'TTTACATATG GCGAGCTGGCAGGCGCATCTT 3'	5'CAGACTCGAG CCGCGCTACCGCCTCTTGCTC 3'
<i>LipW_orfW</i>	5'TTTACATATG GCATTACG 3'	5'CAGACTCGAG GGCTTGCGCGCGGTT 3'

Por PCR, utilizando os primers específicos para a região codificante do gene de lipase de LipX, LipG, Lip Y, LipW, a região de interesse foi amplificada. A reação de PCR foi feita com 2 µL de tampão 10X *Taq* polimerase; 2 µL de 2,5 mM de dNTPs; 1µL de Primer Fe R 5 pmol/µL, Xng de DNA, 1 µL de BSA 10X, 5 U de *Taq* polimerase, em um volume final de 20 µL. O produto de PCR foi purificado em coluna de sílica utilizando-se o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). O resultado da amplificação em gel de agarose 1%. Os amplicons foram posteriormente ligados ao vetor pGEM-T easy.

3.8. Reações de ligação ao vetor pGEM-T easy dos amplicons

O vetor pGEM-T easy possui as características favorecidas para manter as construções em alta quantidade. A ligação ao vetor de foi feita: 1 µL de pGEM-T easy 1 µL de tampão ligase 10X ,1 µL de enzima T4 Ligase 1 U/µL 20 ng do produto de PCR, reação com volume final de 10 µL. As reações de ligação permaneceram a 16°C por 16 horas. A enzima ligase foi inativada por 15 minutos a 65°C. A amostra foi dialisada por meia hora em membrana de nitrocelulose 0,025 µm (Millipore) antes de ser transformada em células eletrocompetentes de *E. coli* da cepa EPI300.

3.8.1. Digestão do plasmídeo e dos genes

Os amplicons ligados ao vetor pGEM-T easy e o plasmídeo de escolha pET21a(+) (Novagen) foram digeridos com as enzimas de restrição *Xho*I e *Nde*I, para possibilitar a ligação do gene ao vetor de clonagem. A digestão foi feita com 2 µL de Tampão D 10X (Promega, EUA), 1 µL de enzima *Xho*I 10 u/µl (Promega), 1µL de enzima *Nde*I 10 u/µl (Promega), 20 ng de DNA (amplicon ou pET21a(+)), reação com volume final de 20 µL, a 37°C, por 16 horas. As enzimas foram escolhidas pela presença de sítios de clivagem no múltiplo sítio de clonagem do vetor, não estando presentes, no entanto, na sequência do gene em estudo. Ao término do tempo de digestão, a enzima foi inativada a 65°C por 15 minutos. O vetor e o gene digeridos foram confirmados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

3.8.2. Reações de ligação ao vetor pET21a(+)

A ligação ao vetor de clonagem foi feita com a seguir: 2 µL de pET21a(+) (Novagen), 2 µL de tampão ligase 10X (Promega, EUA), 1 µL de enzima T4 Ligase 1 U/µL (Promega, EUA), 20 ng do produto de PCR digerido com as enzimas *Xho*I e *Nde*I, reação com volume final de 20 µL. As reações de ligação permaneceram a 16°C por 16 horas. A enzima ligase foi inativada por 15 minutos a 65°C. A amostra foi dializada por meia hora em membrana de nitrocelulose 0,025 µm (Millipore) antes de ser transformada em células eletrocompetentes de *E. coli* da cepa BL21 (DE3).

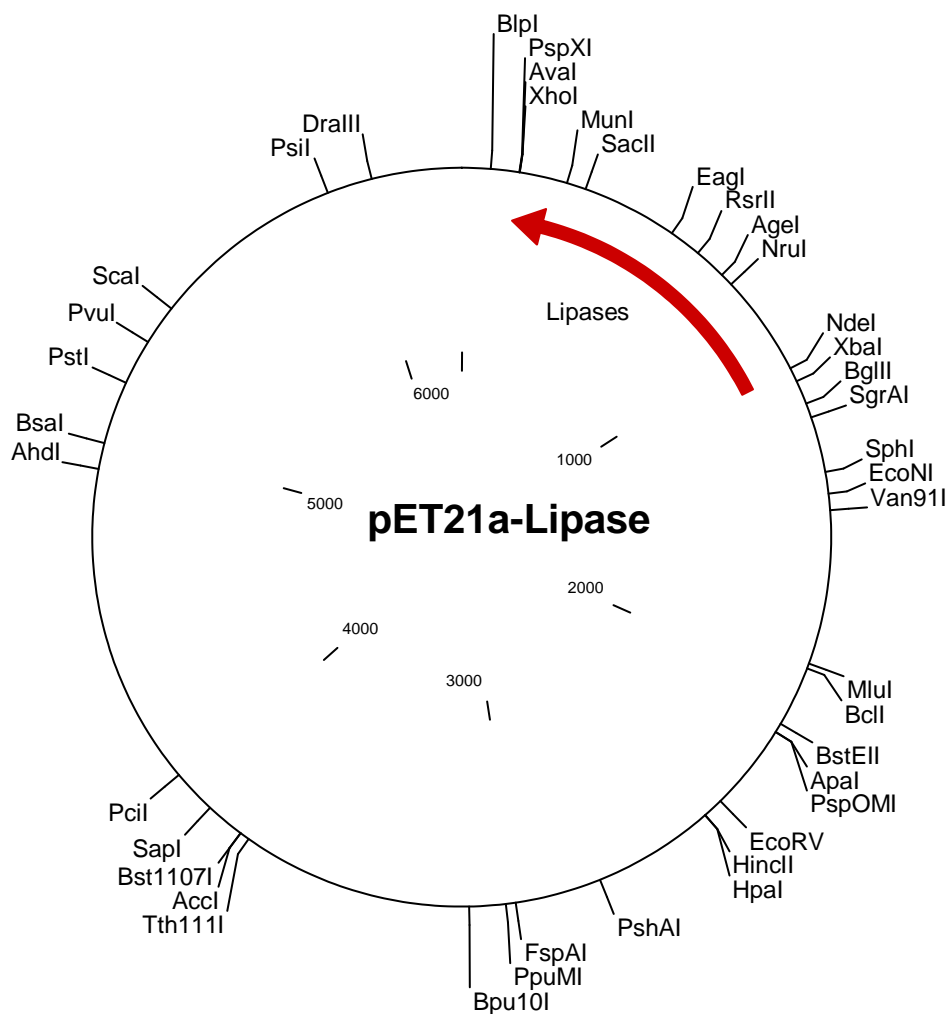


Figura 14. Mapa do vetor pET21a(+) com os sítios de restrição e a ligação dos genes entre o sítio do XhoI e NdeI.

3.8.3. Transformação em cepa BL21 (DE3)

Na transformação foi utilizado 1 μ L da ligação. O vetor ligado ao inserto foi transformado por eletroporação em células competentes de *E. coli* da cepa BL21 (DE3) em cuveta Gene Pulse® Cuvette (Bio-rad Laboratories, Inc.) previamente resfriada em gelo. Fez-se uso do eletroporador Gene Pulsed® (Bio-rad Laboratories, Inc.), ajustado para os seguintes padrões: capacitância 25 μ F; resistência 200 e 700 Ω e voltagem 2.5 kV. Às células eletroporadas foi adicionado 1 mL de meio de cultura SOC contido em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.

As células em meio SOC foram coletadas da cuveta, adicionadas em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e permaneceram a 37°C por uma hora. Após o período de incubação, as células foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio LB ágar adicionado de antibiótico ampicilina (100 µg/mL) e 1% (v/v) de tributirina. As placas permaneceram em estufa *overnight* a 37°C.

3.8.4. Verificação da presença do inserto

Colônias resultantes da transformação em BL21 (DE3) foram aleatoriamente escolhidas para confirmação da presença de inserto. Os resultados foram visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Com o produto de uma das extrações de DNA plasmidial foi feita nova PCR utilizando os primers específicos para o gene de lipase, com o intuito de confirmar a amplificação da região de interesse. A reação de PCR foi feita com 2 µL de tampão 10X *Taq* polimerase; 2 µL de 2,5 mM de dNTPs; 1,5 mM de MgCl²; 1 µL de Primers F e R de cada gene 5 pmol/µL, X ng de DNA, 1 µL de BSA 10X, 5 U de *Taq* polimerase, em um volume final de 20 µL. O resultado foi visualizado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Este clone recombinante foi escolhido para indução e expressão da proteína.

3.9. Cinética de produção da lipase heteróloga

Os clones LipWorfW e o LipYorfY foram inoculados em 5 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina permanecendo sob agitação (240 rpm) a 37°C por 16 horas. Os 5 mL foram inoculados em 100 mL de meio LB e cultivados sob agitação (240 rpm, 37°C), até atingir OD₆₀₀ entre 0,3 e 0,6. A expressão da proteína foi induzida por adição de IPTG na concentração final de 1 mM. A cultura foi mantida a 37°C com agitação (240 rpm) por 3 horas. Alíquotas de 100 µL foram coletadas nos tempos 0 (antes da indução) e após 1 hora, 2 horas e 3 horas da adição de IPTG sendo que a cada hora foi coletada uma de amostras. Estas células foram centrifugadas (3 minutos a 16.100 g) e o sobrenadante foi descartado tendo sido então armazenadas a -20°C até a

utilização por análise em gel *SDS-PAGE*. Um inóculo com o vetor pET21a (+) foi feito nas mesmas concentrações e condições do clone tendo sido este igualmente cultivado em 100 mL de meio LB sob agitação (240 rpm, 37°C) e adicionada mesma concentração final de IPTG, sendo utilizada como um controle negativo. Foram coletadas alíquotas destas células em crescimento para análise e verificação da indução em gel *SDS-PAGE*. As amostras foram ressuspensas em 7,5 µL de H²O e 7,5 µL de tampão de corrida 5X, aquecidas a 100°C por 10 minutos e aplicadas em gel de acrilamida *SDS-PAGE*.

3.9.1. Análise da massa molecular por SDS-PAGE

O resultado da cinética de indução por análise da massa molecular foi realizada em gel de acrilamida *SDS-PAGE* a 13%. Foram feitos mini-géis utilizando o *Mini-Proteome SDS-PAGE* (Bio-rad Laboratories, Inc.). O gel separador foi feito com 2 mL de solução de acrilamida/bisacrilamida (29:1) a 30%, 1,23 mL de tampão Tris pH 8,8, 1,70 mL de água destilada, 50 µL de Persulfato de amônio 10% e 3 µL de TEMED. O gel de empilhamento foi feito utilizando 0,42 mL de solução de acrilamida/bisacrilamida (29:1) a 30%, 0,34 mL de tampão Tris pH 6,8, 1,75 mL de água destilada, 25 µL de persulfato de amônio 10% e 3 µL de TEMED. A corrida foi realizada a 200 mV e 70 mA por 40 minutos. Para comparação das massas moleculares, foram aplicados 5µL do marcador molecular proteico. Após a corrida, o gel foi corado em solução azul de Coomassie *R-250* e descorado em solução contendo 40% de metanol e 10% de ácido acético glacial em água destilada.

3.9.2. Teste de solubilidade

Para testar solubilidade, o *pellet* de bactéria contendo a proteína expressa foi lisada com tampão de lise (100mM NaH₂PO₄; 10mM Tris.Cl; 8M urea) contendo 50µl/ml de lizosima e 10µl de inibidor de protease (1:100), e esta solução foi incubada de 5 a 10 minutos no gelo. Concluído esta etapa foi centrifugado a velocidade 16000 x g por 12 minutos à 4°C, e o sobrenadante

formado foi transferido para novo tubo, que corresponde a fração solúvel, e o *pellet* foi ressuspendido com tampão de PBS 1x o qual representa a fração insolúvel e aplicada no eletroforese de PAGE como descrito anterior.

3.9.3. Western blotting

A proteína por eletroforese foi transferidas para a membrana de nitrocelulose com o auxílio de um *transblot* (Trans Blotter, BioRad) nas condições: 15V, 150 mA por 30 minutos. Após a verificação da confirmação da transferência pelo marcador pré-corado PageRuler (Fermentas), a membrana então foi bloqueada com a solução de PBS 1X e 5% de leite em pó desnatado por 1 hora sob agitação. Posteriormente a membrana foi lavada três vezes com PBS 1X Tween 0,1%. Após a lavagem, a membrana foi novamente incubada por 2 horas com tampão contendo o anticorpo primário (1:5000). A membrana foi lavada novamente 3 vezes com solução PBS 1X Tween 0,1% e incubada com um novo tampão contendo o anticorpo secundário em proporção de 1:3000. Essa incubação foi realizada sob agitação por 2 horas em temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada três vezes com a mesma solução de PBS 1X e Tween, e a revelação foi feita em 10 ml de tampão alcalino (100mM de tris e NaCl, 5mM de MgCl₂ pH9,5) e os substratos da fosfatase alcalina: 50µl de Nitroblue Tetrazolium (NBT) (10mg/ml) e 30µl de 5- Bromo-4- Cloro-3-Indolil Fosfato (BCIP) (10mg/ml) foram adicionados. A revelação foi realizada em ambiente escuro.

3.10. Purificação de lípase heteróloga em condições desnaturante

A proteína insolúvel foi desnaturada com tampão contendo urea (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris.Cl; 8M urea pH 8) e adicionado 1 ml de *MagneHis Ni-Particles* para cada 4 ml de bactéria lisada e foi misturado gentilmente no shaker à 200 rpm durante 30 minutos. Posteriormente todo o volume da amostra foi colocado na coluna e, após a lavagem com tampão de ligação as

frações com tampão de eluição (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris.Cl; 8 M urea) foram coletada nos tubos falcons. A metade do *flow-through* foi aplicada para coluna novamente e foi lavado com 4 ml de tampão de ligação. Após a remoção completa do tampão, foi lavado com 4 ml de tampão C (100mM Na₂PO₄; 10mM Tris.Cl; 8M urea pH 6.3) duas vezes. E então foi eluída 4 vezes com 0,5 ml de tampão D (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris.Cl; 8 M urea pH 5.9) seguido por 4 lavagens consecutivas de tampão E (100 mM Na₂PO₄; 10 mM Tris.Cl; 8 M urea pH 4,5). Todas as frações foram coletadas para análise em SDS-PAGE.sendo realizado conforme instrução do fabricante.

3.10.1. Diálise com Tampão Fosfato

Para superar o problema imposto à caracterização enzimática pela desnaturação da proteína, tentou-se renaturar a lipase através do tampão fosfato, pH 7.5. A proteína LipW_orfW foi colocada em uma membrana de diálise e deixada em tampão fosfato por 3 horas sendo que de hora em hora o tampão foi trocado.

4. Resultados

4.1. Confirmação dos fenótipos dos clones

Os Clones X, Y e W foram retransformados para confirmação dos fenótipos. Os transformantes foram então plaqueados em meio LB-ágar contendo 1% (v/v) de tributirina, e com óleo de dendê e rodamina com 20 µg/mL de tetraciclina, tendo permanecido em estufa a 37°C por 16 horas para crescimento das colônias. Depois deste período, as placas foram deixadas a temperatura ambiente por mais cinco dias. A atividade lipolítica foi então confirmada pela formação de halo em torno das colônias, resultado da degradação da tributirina e do óleo de dendê contida no meio de cultura na figura 15, e na figura 16. Procedeu-se a extração do DNA plasmidial.

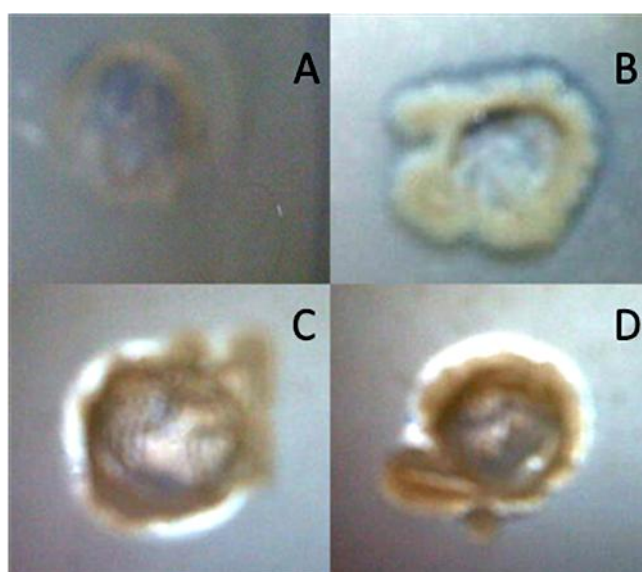


Figura 15. Avaliação da atividade lipolítica em placa de LB com tributirina 1% após transformação em células *E. coli* EPI-300. Clones mostrando o halo hidrólise ao redor das colônias após 3 dias de crescimento. A – ClonX; B – CloneY, C – CloneW. Plasmídeo sem inserto indicando a ausência de halo de hidrólise: pCF-430 – D.

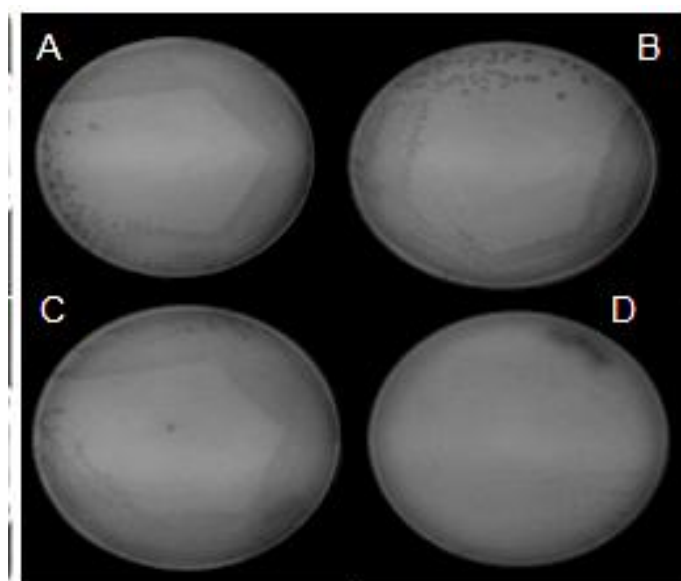


Figura 16. Avaliação da atividade lipolítica em placa de LB com com óleo de dendê e rodamina e após transformação em células *E. coli* EPI-300. Clones mostrando o halo hidrólise ao redor das colônias após 3 dias de crescimento. A – ClonX; B – CloneY, C – CloneW. Plasmídeo sem inserto indicando a ausência de halo de hidrólise: pCF-430 – D.

4.2. Extração de DNA plasmidial e análise do perfil de restrição

O DNA plasmidial foi digerido com a enzima de restrição *Pst* I. Essa enzima foi utilizada na digestão pelo fato de ter sido usada na construção da biblioteca, pois o vetor pCF430 possui um sítio de restrição para *Pst* I, no qual os fragmentos de DNA puderam se ligar as extremidades coesivas (Figura17).

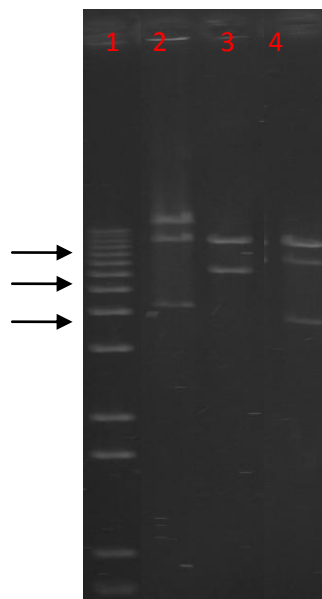


Figura 17. Análise eletroforética da digestão do DNA plasmidial do clone controle (*E. coli* EPI-300 transformada com o vetor pCF-430) e dos clones com atividade lipolítica após digestão com a enzima de restrição *Pst* I. 1: 1 kb ladder; 2: Clone X; 3: Clone Y e 4: Clone W.

4.3. Sequenciamento

Após o sequenciamento dos Clones X, Y e W as análises foram feitas inicialmente usando o *Staden Package*, para que os contigs fossem montados e as sequências sobrepostas. Para a predição de ORFs em todos os insertos foi utilizado o programa ORF Finder (*Open Read Frame Finder*) e o Blastp, para os Clones X, Y e W. Foram consideradas prováveis ORFs aquelas que apresentam tamanho compatível com a maioria dos genes bacterianos, ou seja, em torno de 1 Kb. Detalhes das análises de cada clone podem ser observados nas tabelas 7, 8 e 9.

Tabela 7. Prováveis genes identificados nos insertos metagenômicos do clone X

Clones/ORF	AA	Proteína homóloga	Microorganismo	% Identidade/ similaridade	N. Acesso
CloneXlipX	320	Lipase/Esterase	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	253/319(79%)	ZP09648202.1
CloneXorf1	253	Putative glutamine synthetase	<i>Streptomyces</i> sp.	73/171(43%)	ZP08455641.1
CloneXorf2	367	Hypothetical protein	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	232/368(63%)	ZP09439174.1
CloneXorf3	335	Glutaminesynthetase II	<i>Bradyrhizobium</i>	307/334(92%)	ZP09420306.1

Tabela 8. Prováveis genes identificados nos insertos metagenômicos do clone Y

Clones/ORF	AA	Proteína homóloga	Microorganismo	% Identidade/ similaridade	N. Acesso
CloneYlipY	306	Putative esterase	<i>Acidocella</i> sp.	148/297(50%)	ZP11251168.1
CloneYlipG	295	Glycoside hydrolase16 family protein	<i>Curtobacterium</i> sp.	131/248(53%)	ACH56964.1
CloneYorf1	389	Cyclohexanone monooxygenase	<i>Cupriavidus basilensis</i>	143/275(52%)	ZP09628474.1
CloneYorf2	365	Folate-binding protein	<i>Terriglobus saanensis</i>	117/339(35%)	ZP03628812.1

Tabela 9. Prováveis genes identificados nos insertos metagenômicos do clone W

Clones/ORF	AA	Proteína homóloga	Microorganismo	% Identidade/ similaridade	N. Acesso
CloneWorf1	282	Aldolase Classe II	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D	(70%)100/142	NC012856.1
CloneWorf12	405	Acil-CoA desidrogenase	<i>Haliangium ochraceum</i>	(72%)120/166	
CloneWlipW	288	Lipase/Esterase	Bactéria não cultivável	(63%)170/266	EF213586.1
CloneWorf3	873	Uridil transferase	<i>Candidatus Koribacter versatilis</i> Ellin345	(58%)90/154	

O Clone X (Anexo I) tem 13.650 pares de base. Após análise de sua sequência, foram identificadas quatro ORFs. A ORF 1 (base 11588 a 12349), com 253 resíduos de amino ácidos codifica para uma putative glutamine synthetase provavelmente proveniente de um *Streptomyces* sp. A ORF 2 (base 4602 a 5705), com 367 resíduos de amino ácidos, codifica para uma hypothetical protein, proveniente de *Bradyrhizobium* sp. A ORF 3 (base 11453 a 12460), com 335 resíduos de amino ácidos, codifica para uma Glutaminesynthetase II que provavelmente provém de *Bradyrhizobium* sp. Por fim a ORFlipX (base 8398 a 9360), com 320 resíduos de amino ácidos, codifica para uma *lípase* que provavelmente provém de *Bradyrhizobium* sp. (Figura 18).

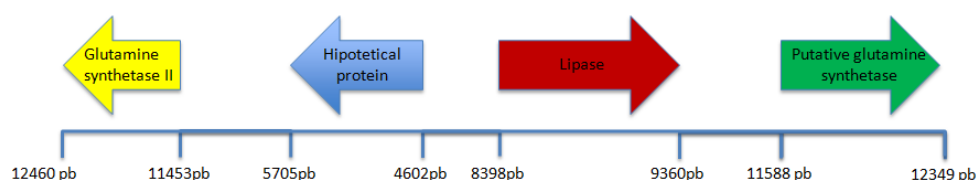


Figura 18. Orientação das ORF's encontradas no lipX: Glutamine synthetase II , Hipotetical protein , Lipase/esterase e Putative glutamine synthetase.

O Clone Y, tem 6650 pares de base (Anexo I) Após análise de sua sequência, foram identificadas quatro ORFs. A ORF 1 (3765 a 4650), com 389 resíduos de amino ácidos codifica para uma cyclohexanone monooxygenase provavelmente proveniente de um *Acidocella* sp. A ORF 2 (base 5335 a 6432), com 365 resíduos de amino ácidos, codifica para uma Folate-binding protein, proveniente de *Terriglobus saanensis*. A ORFlipY (base 1609 a 689), com 306 resíduos de amino ácidos, codifica para uma *esterase putativa* que provavelmente provém de *Acidocella* sp. Por fim a ORFlipG (base 1851 a 3020), com 295 resíduos de amino ácidos, codifica para uma glycoside hydrolase 16 family protein que provavelmente provém de *Curtobacterium* sp (Figura 19).

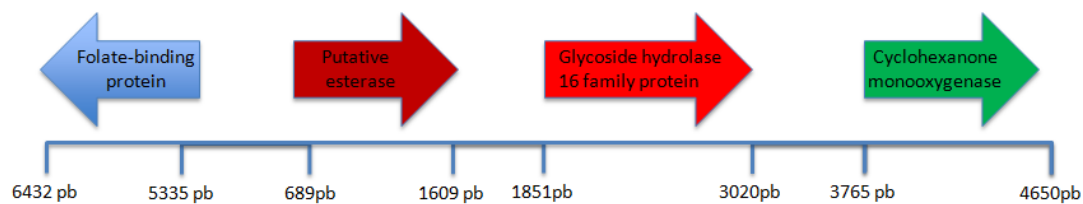


Figura 19. Orientação das ORF's encontradas no lipY: Folate-binding protein, Putative esterase, Glycoside hydrolase 16 family protein e Cyclohexanone monooxygenase

O Clone W, tem 10.000 pares de base. Após análise de sua sequência, foram identificadas quatro ORFs. A ORF 1 (base 530 a 970), com 282 resíduos de amino ácidos codifica para uma Aldolase Classe II provavelmente proveniente de um *Ralstonia pickettii* 12D. A ORF 2 (base 1632), com a 2256) 405 resíduos de amino ácidos, codifica para uma Acil-CoA desidrogenase, proveniente de *Haliangium ochraceum*. A ORF 3 (base 3540 a 4000), com 873 resíduos de amino ácidos, codifica para uma Uridil transferase que provavelmente provém de *Candidatus Koribacter versatilis* Ellin345. Por fim a ORFlipW (base 2427 a 3240), com 288 resíduos de amino ácidos, codifica para uma *lípase* (Figura 20).

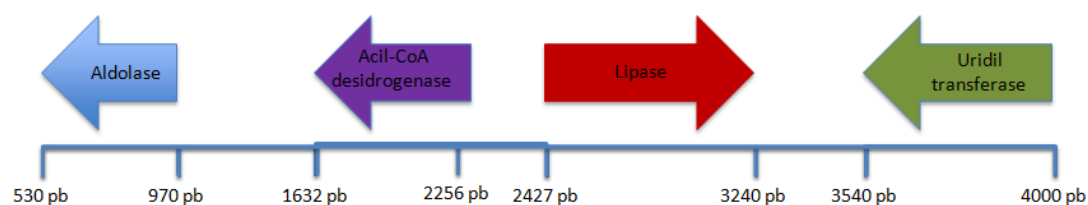


Figura 20. Orientação das ORF's encontradas no lipW: Aldolase, AcilCoA Desidrogenase, Lípase/esterase e Uridil Transferase.

O alinhamento de LipX, LipG, LipY e LipW com enzimas lipolíticas que mostraram maior similaridade foi realizado através do ClustalW2.

Os dendrogramas filogenéticos foram construídos no programa MEGA 5.0 (Tamura, Peterson et al., 2011) utilizando o modelo. O valor de reamostragem (bootstrap) foi de 1000 repetições para calcular a significância estatística de cada clado.

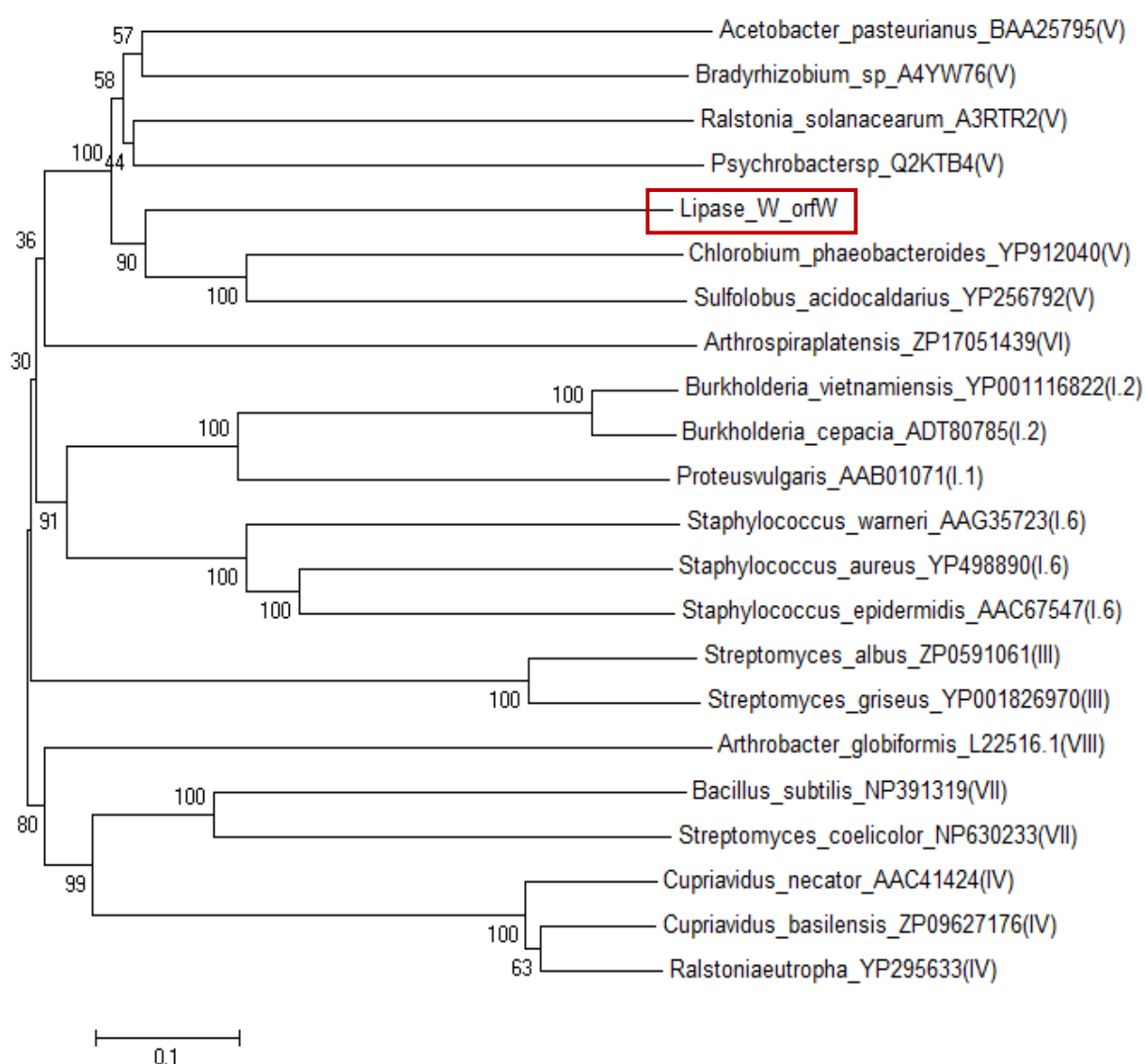


Figura 21. Árvore filogenética da LipW_orfW. A árvore foi construída pelo método *Neighbor-Joining* utilizando o software MEGA 5.05. Foi calculada a significância estatística para cada clado utilizando 1.000 repetições de *bootstrap*. Utilizaram-se as sequências proteicas de cada família de enzimas lipolíticas após análise no Blastp. O número de acesso de cada sequência está indicado após o nome da espécie da qual a enzima foi originada e a família entre parênteses

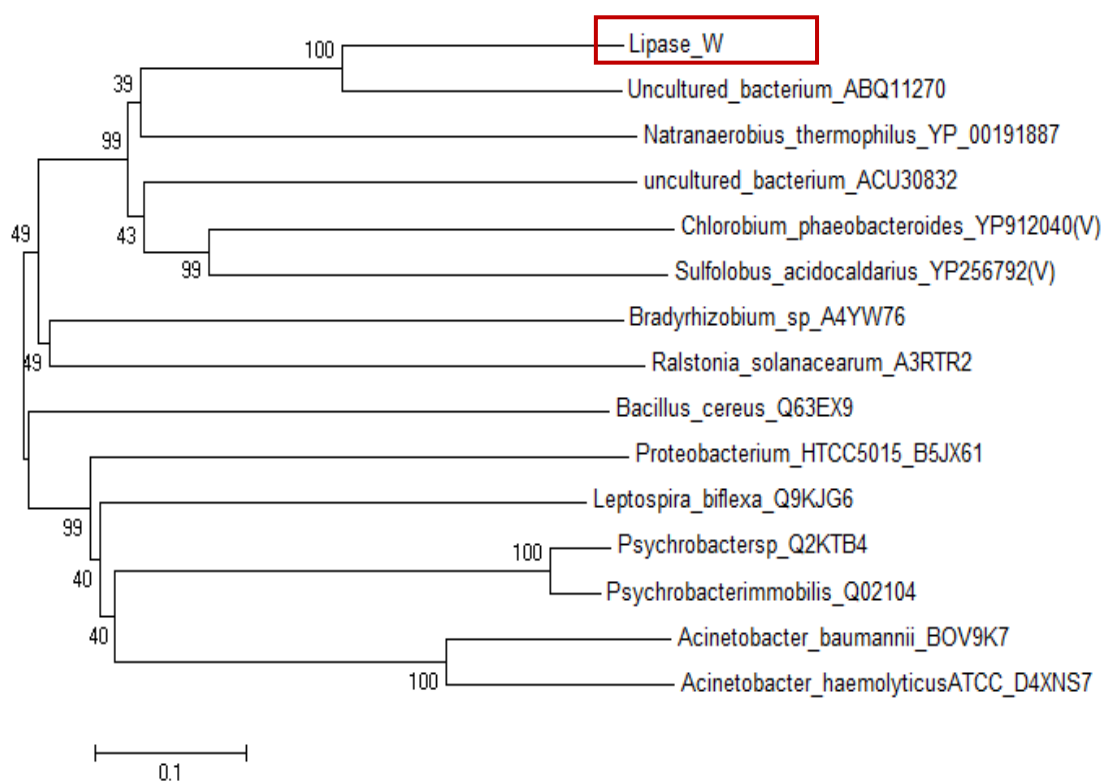


Figura 22. Árvore filogenética da LipW_orfW. A árvore foi construída pelo método *Neighbor-Joining* utilizando o software MEGA 5.05. Foi calculada a significância estatística para cada clado utilizando 1.000 repetições de *bootstrap*. Utilizaram-se as sequências proteicas das 10 melhores hits após análise no Blastp. O número de acesso de cada sequência está indicado após o nome da espécie da qual a enzima foi originada.

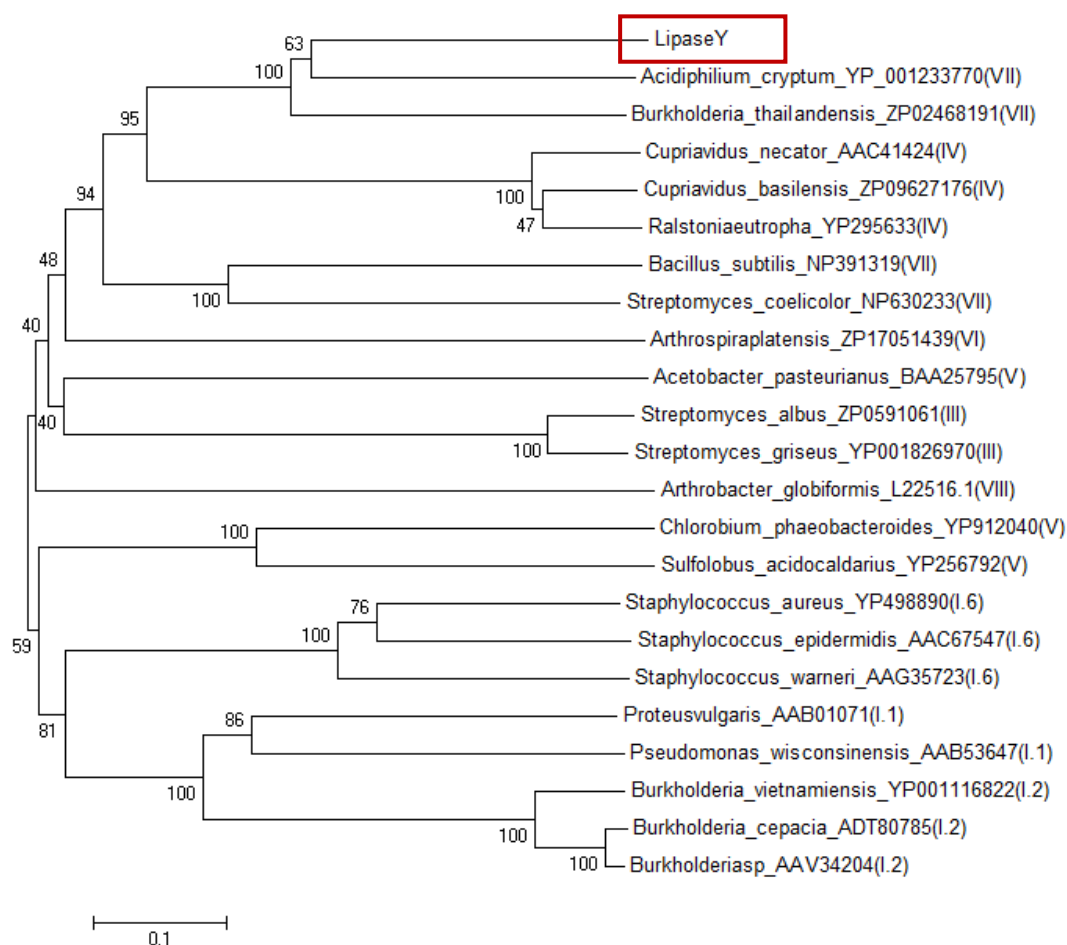


Figura 23. Árvore filogenética da LipY_orfY. A árvore foi construída pelo método *Neighbor-Joining* utilizando o software MEGA 5.05. Foi calculada a significância estatística para cada clado utilizando 1.000 repetições de *bootstrap*. Utilizaram-se as sequências proteicas de cada família de enzimas lipolíticas após análise no Blastp. O número de acesso de cada sequência está indicado após o nome da espécie da qual a enzima foi originada e a família entre parênteses.

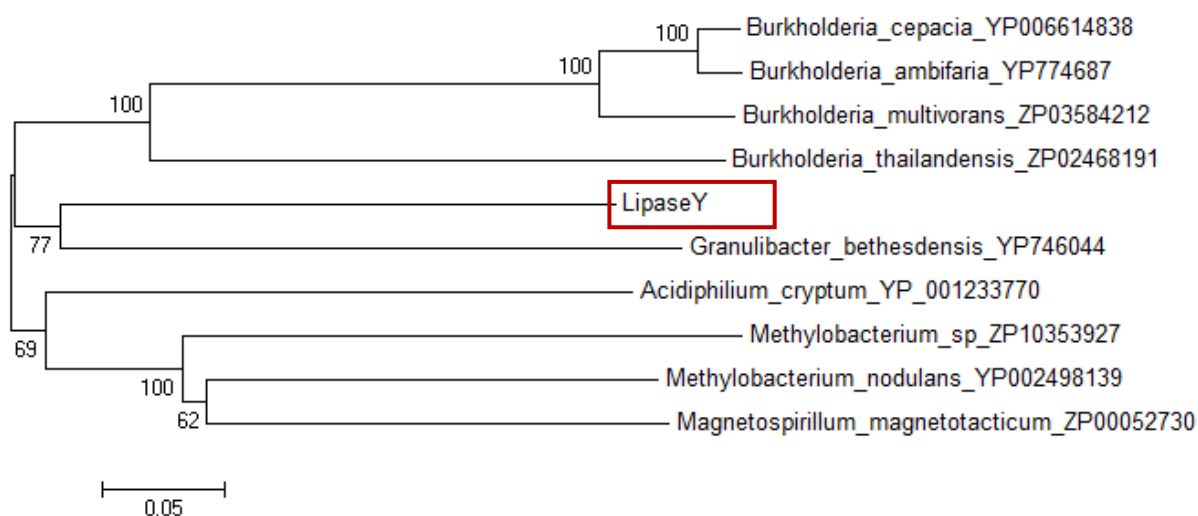


Figura 24. Árvore filogenética da LipY_orfY. A árvore foi construída pelo método *Neighbor-Joining* utilizando o software MEGA 5.05. Foi calculada a significância estatística para cada clado utilizando 1.000 repetições de *bootstrap*. Utilizaram-se as sequências proteicas das 10 melhores hits após análise no Blastp. O número de acesso de cada sequência está indicado após o nome da espécie da qual a enzima foi originada.

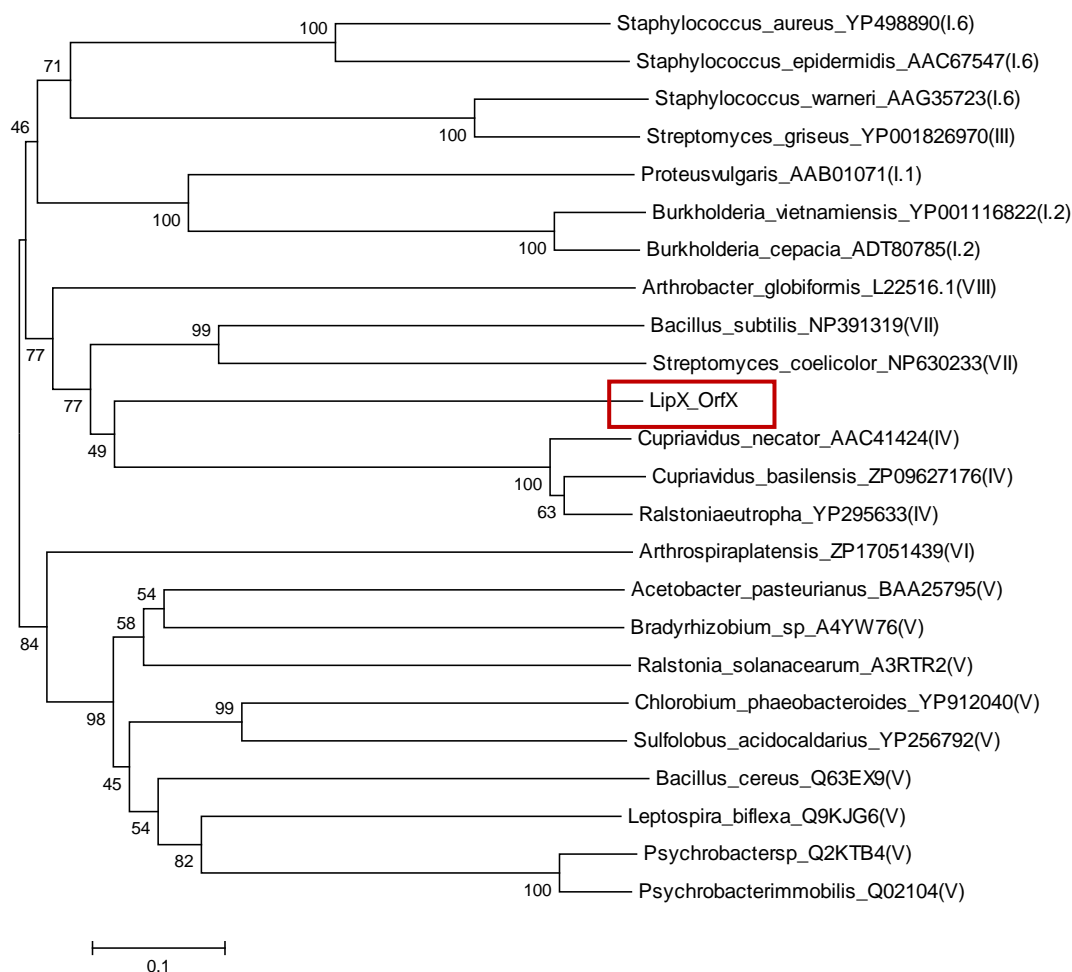


Figura 25. Árvore filogenética da LipX_orfX. A árvore foi construída pelo método *Neighbor-Joining* utilizando o software MEGA 5.05. Foi calculada a significância estatística para cada clado utilizando 1.000 repetições de *bootstrap*. Utilizaram-se as sequências proteicas de cada família de enzimas lipolíticas após análise no Blastp. O número de acesso de cada sequência está indicado após o nome da espécie da qual a enzima foi originada e a família entre parênteses.

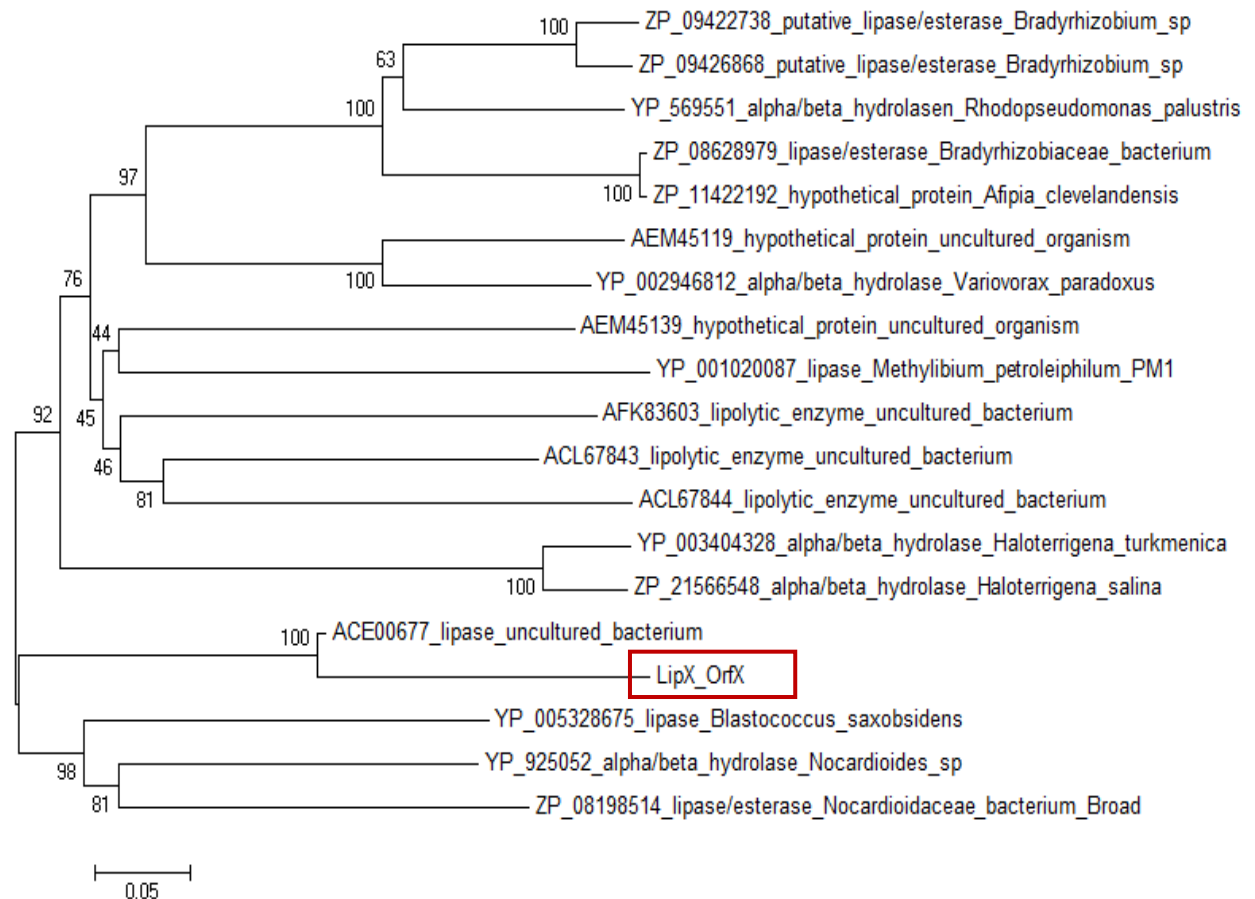


Figura 26. Árvore filogenética da LipX_orfX. A árvore foi construída pelo método *Neighbor-Joining* utilizando o software MEGA 5.05. Foi calculada a significância estatística para cada clado utilizando 1.000 repetições de *bootstrap*. Utilizaram-se as sequências proteicas das 20 melhores hits após análise no Blastp. O número de acesso de cada sequência está indicado antes do nome da espécie da qual a enzima foi originada.

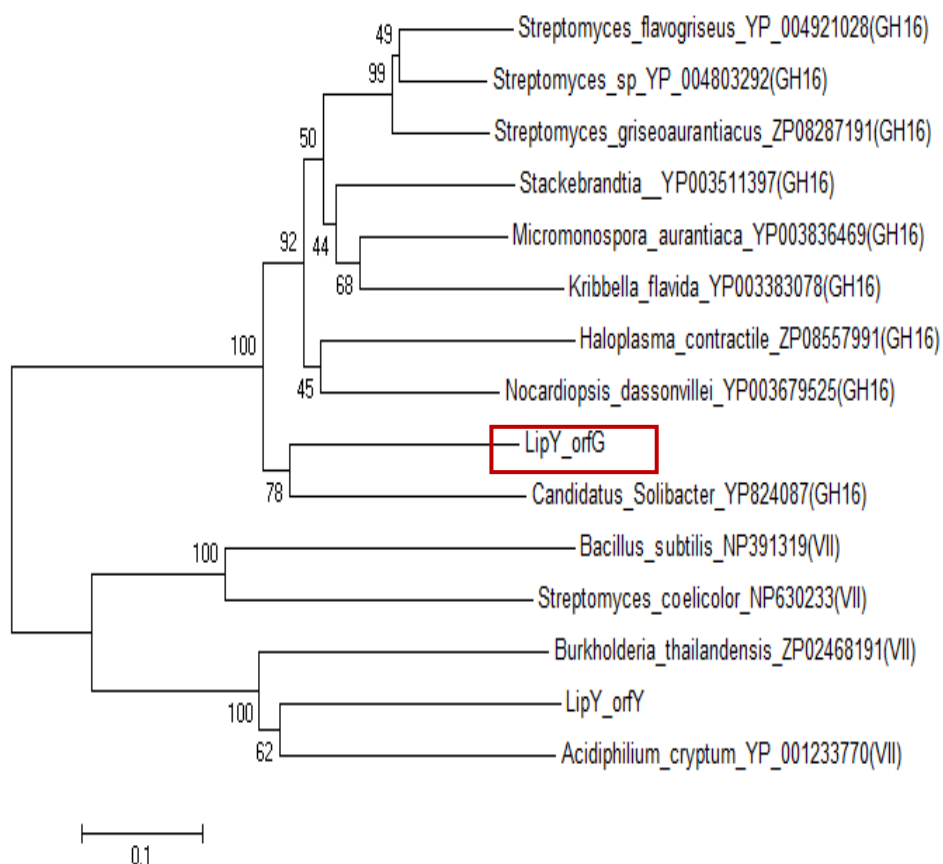


Figura 27. Árvore filogenética da LipY_orfG. A árvore foi construída pelo método *Neighbor-Joining* utilizando o software MEGA 5.05. Foi calculada a significância estatística para cada clado utilizando 1.000 repetições de *bootstrap*. Utilizaram-se as sequências proteicas dos primeiros 10 *hits* após análise no Blastp. Como *outgroup* foi utilizada a sequência proteica da orfY do Clone Y e as sequências da mesma família que ela. O número de acesso de cada sequência está indicado após o nome da espécie da qual a enzima foi originada e a família entre parênteses.

4.4. Subclonagem do LipWorfW e do LipYorfY

A região correspondente a LipW foi amplificada com primers específicos, ligada em vetor de pGEM-T e transformada em células da cepa de *Escherichia coli* EPI300. Utilizando o par de oligonucleotídeos sintéticos complementares às duas regiões específicas da lipase, a sequência nucleotídica de interesse em LipW foi amplificada em seu tamanho esperado para posterior ligação no vetor pGEM-t easy de 890 pares de base e digestão com enzimas de restrição.

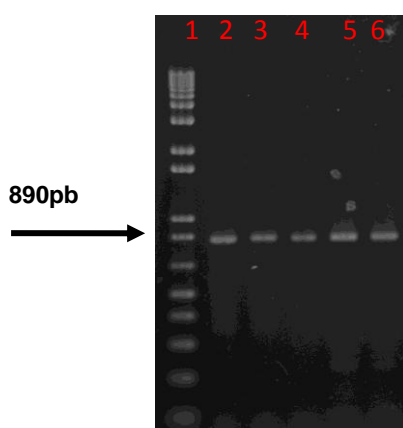


Figura 28. PCR utilizando primer específico para a região da lipase LipW, 1kb plus DNA ladder (Invitrogen) 2-6 PCR utilizando primer específico para a região da lipase LipW.

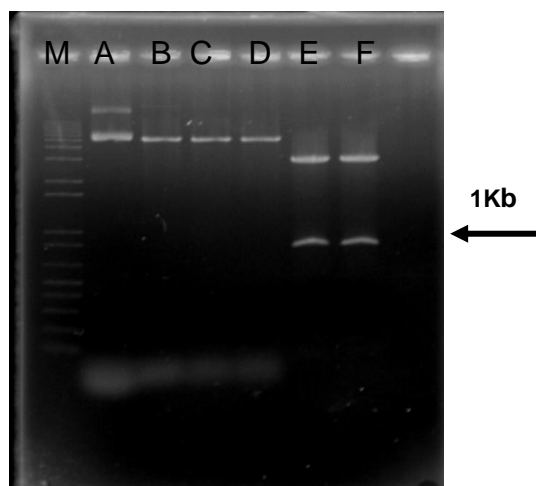


Figura 29. Digestão do vetor de clonagem pET 21a+ e Clones apresentando insertos confirmando a ligação no vetor pGEM-T easy em gel de agarose 0,8% (TBE). M – 1kb plus DNA ladder (Invitrogen), A- pET21a(+) intacto, B- pET21a(+) digerido com NdeI, C- pET21a(+) digerido com XhoI, D- pET21a(+) digerido com NdeI e XhoI, E-

Amplicon lipW/pGEMT-easy digerido com NdeI e XhoI, F- Amplicon lipW/pGEMT-easy digerido com NdeI e XhoI.

Procedeu-se a ligação do inserto da LipW clonada em vetor de expressão pET21a(+), e transformação em células da cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3).

O LipYorfY por ter um sítio de restrição no meio da sequência foi sintetizado o gene LipYorfY e a clonagem em vetor de expressão pET21a(+)vetor na empresa Genone de Rio de Janeiro.

Procedeu-se a transformação do LipY/orfY/ pET21a(+) e do LipW/orfW/ pET21a(+) em células da cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3).

Após a transformação, algumas colônias apresentaram o fenótipo positivo para degradação da tributirina contida no meio de cultura em um período curto após o plaqueamento. Após uma semana de crescimento em placa, no entanto, as colônias apresentaram fenótipo positivo para degradação da tributirina contida no meio de cultura, indicando conterem todas as colônias a região específica para a atividade lipolítica. Procedeu-se extração plasmidial em pequena escala partindo de quatro colônias obtidas, no intuito de confirmar a presença do inserto. As colônias, apresentando halo de degradação da tributirina contida no meio de cultura foram crescidas em meio LB contendo antibiótico ampicilina (10 µg/mL) a 37°C por 16 horas sob agitação (240 rpm). A extração do DNA plasmidial foi feita pelo protocolo *Best Miniprep Protocol Ever*. Observa-se no gel de agarose 1% que o clones apresenta inserto de 890 pares de base de LipWorfW e de 1kb de LipYorfY (Figura 26).

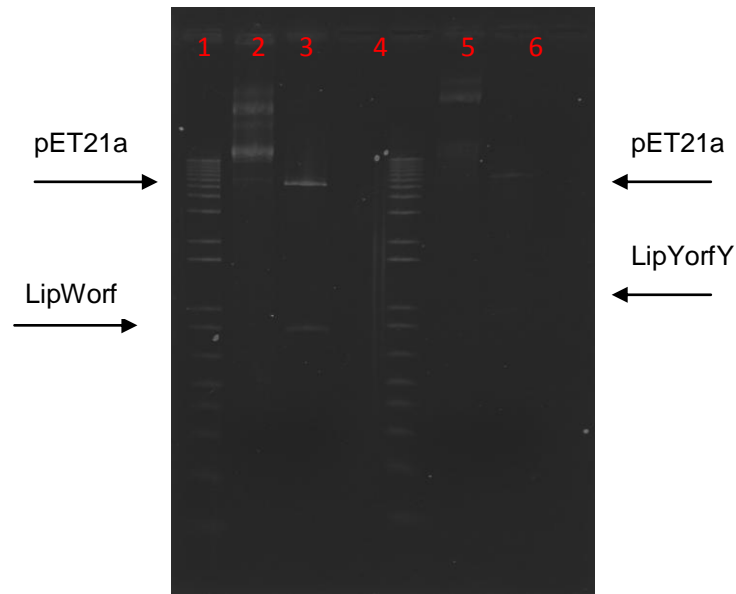


Figura 30. Gel de agarose apresentando o inserto confirmando a ligação no vetor pET21a (+) e clonagem em célula BL21(DE3), 1 e 4 1kb plus DNA ladder (Invitrogen, 2-LipW_orfW miniprep, 3–digestão do LipWorfW/ pET21a (+) com NdeI e XhoI, 5- lipY_orfY miniprep, 6–digestão do LipYorfY/ pET21a (+) com NdeI e XhoI .

Uma alíquota da transformação do clone LipW_orfW em BL21 (DE3) e do clone LipY_orfY foi plaqueada em placa de Petri contendo meio LB-ágar acrescido de tributirina 1% (v/v) para verificar a ocorrência de hidrólise da tributirina contida no meio. O vetor pET21a(+) foi transformado em célula da mesma cepa de *E. coli* BL21 (DE3) para ser utilizado como controle negativo, indicando ser a atividade hidrolítica inerente à região de LipW_orfW e de LipY_orfY e não do vetor de escolha (Figuras 27 e 28).

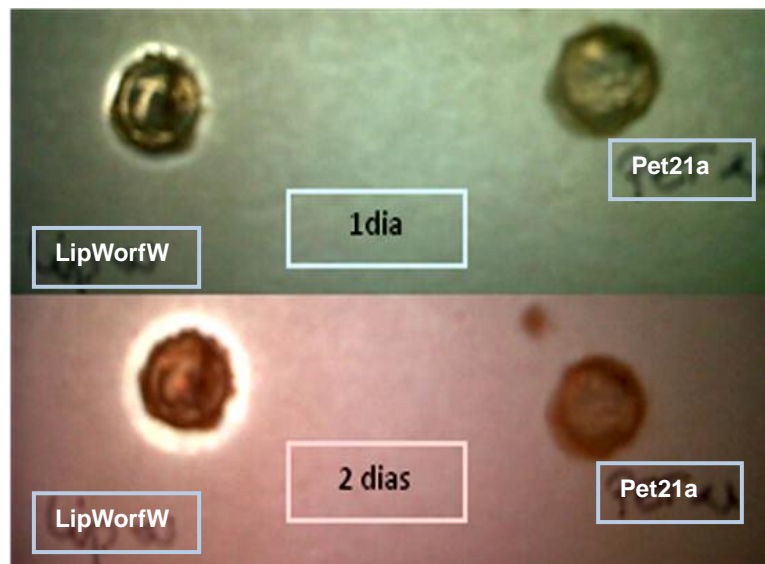


Figura 31. Placas com meio LB-ágar suplementado com tributirina 1% (v/v). Na parte esquerda da placa, LipW_orfW transformado em célula competente da cepa de *E. coli* BL21 (DE3), apresentando atividade degradativa da tributirina contida no meio de cultura. Na parte direita da placa, vetor pET21a (+) transformado em BL21 (DE3) não apresentando atividade hidrolítica, indicando ser da porção do gene LipW_orfW a atividade lipolítica, apos 1 dia e após 2 dias

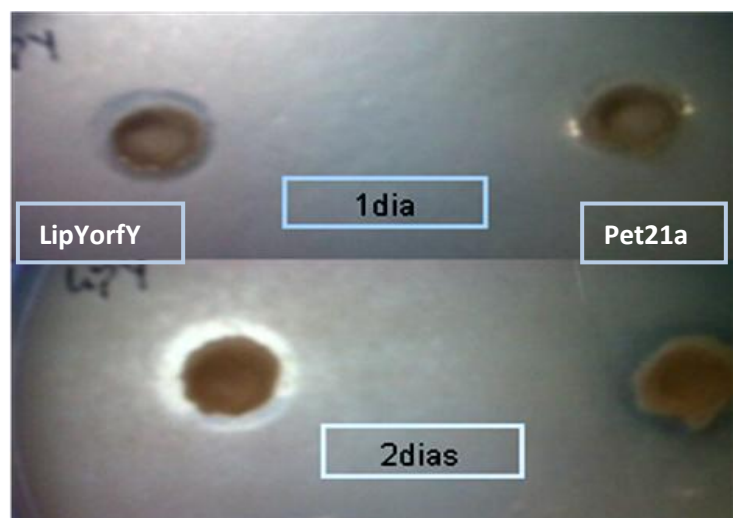


Figura 32. Placas com meio LB-ágar suplementado com tributirina 1% (v/v). Na parte esquerda da placa, LipY_orfY transformado em célula competente da cepa de *E. coli* BL21 (DE3), apresentando atividade degradativa da tributirina contida no meio de cultura. Na parte direita da placa, vetor pET21a (+) transformado em BL21 (DE3) não apresentando atividade hidrolítica, indicando ser da porção do gene LipY_orfY a atividade lipolítica, apos 1 dia e após 2 dias.

4.5. Indução e Expressão

A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) foi escolhida em virtude de propriedade importante para o processo de expressão: apresenta em seu genoma uma cópia do gene cromossomal T7 RNA polimerase sob repressão do operador *lac*, necessário para a expressão heteróloga de proteínas. Uma vez adicionado o agente indutor IPTG, a expressão da T7 polimerase, assim como no gene heterólogo, são ativados.

O estudo de expressão conduzido com LipW foi realizado após a cultura crescida em meio LB de atingir OD600 entre 0,3 e 0,4. Uma alíquota foi coletada antes da adição de IPTG para observação da ocorrência de alguma taxa expressão basal (sem a adição do indutor). A indução do promotor T7 foi iniciada com a adição de IPTG à cultura celular a concentração final de 1mM. A taxa de expressão foi verificada em diferentes tempos de indução (de 1 a 3 horas). A melhor expressão da proteína na linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) foi observada após 3 horas sob agitação (240 rpm) a 37°C.

A indução das células de *E. coli* BL21 (DE3) portadoras do plasmídeo de interesse levou à produção de uma enzima dotada de uma cauda de seis histidinas em sua porção terminal passível de purificação em coluna de afinidade. O perfil de expressão foi observado em gel de eletroforese SDS-PAGE 13%. A cada coleta de amostras, procedeu-se à quantificação das células crescidas por absorbância 600nm, com o intuito de padronizar a quantidade de celular por poço no gel SDS-PAGE 13%.

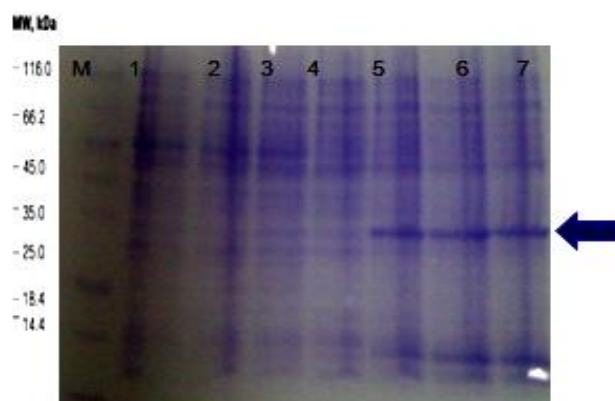


Figura 33. Perfil de gel de eletroforese SDS-PAGE 12% corado com Coomassie G-250. Resultado do crescimento do clone LipW e do vetor pET21a (+) induzidos com IPTG. 1. Vetor pET21a (+) transformado em BL21 (DE3), antes da indução por IPTG. 2. Após uma hora com IPTG. 3. Após duas horas da adição de IPTG. 4. Clone LipW crescido antes da indução por IPTG. 5. Clone induzido por uma hora 6. Duas horas de indução. 7. Três horas de indução. Proteína de aproximadamente 30kDa.

É perceptível que, no decorrer da indução, há um crescente aumento na quantidade da proteína expressa com o passar do tempo, atingindo uma concentração máxima após três horas de indução.

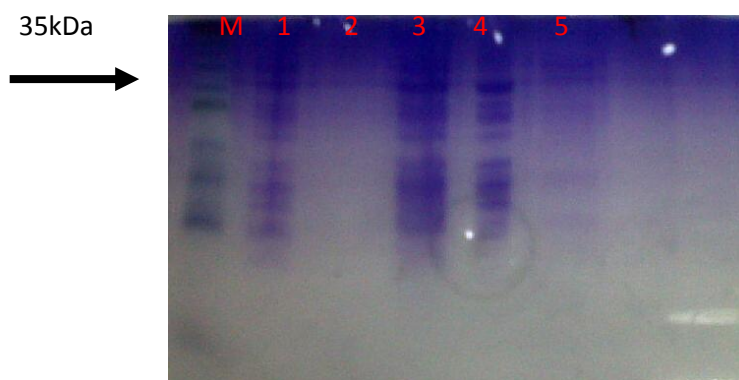


Figura 34. Perfil de gel de eletroforese SDS-PAGE 12% corado com Coomassie G-250. Resultado do crescimento do clone LipY_orfY e do vetor pET21a (+) induzidos com IPTG. 1. Vetor pET21a (+) transformado em BL21 (DE3) após uma 3 horas com IPTG. 3. Clone LipYorfY induzido por 3h por IPTG. 4.fração insolúvel da LipY_orfY, 6-fração isolável da LipY_orfY. Proteína de aproximadamente 34kDa.

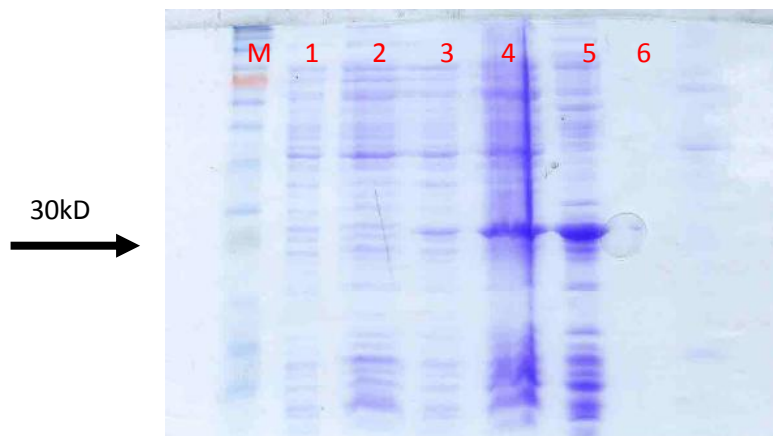


Figura 35. Teste de Solubilidade da lipW_orfW.(M): Marcador de massa molecular *PageRule™ prestained protein ladder* (Fermentas) 1- Vetor pET21a (+) transformado em BL21 (DE3), antes da indução por IPTG, 2- Vetor pET21a (+) transformado em BL21 (DE3), induzido com IPTG por 3h, 3- LipW_orfW), antes da indução por IPTG, 4- LipW_orfW), induzida com IPTG por 3h, 5- fração insolúvel da LipW_orfW, 6- fração solúvel da LipW_orfW.

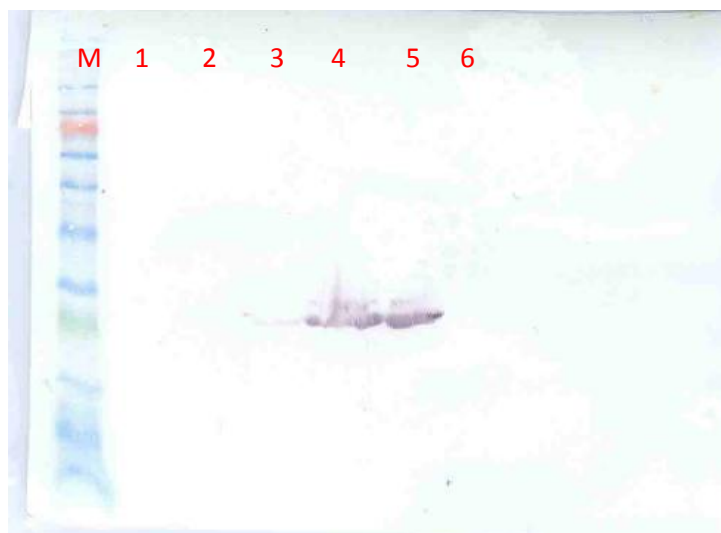


Figura 36. Detecção da expressão do LipW_orfW por *Western blotting*.(M): Marcador de massa molecular *PageRule™ prestained protein ladder* (Fermentas) 1- Vetor pET21a (+) transformado em BL21 (DE3), antes da indução por IPTG, 2- Vetor pET21a (+) transformado em BL21 (DE3), induzido com IPTG por 3h, 3- LipW_orfW), antes da indução por IPTG, 4- LipW_orfW), induzida com IPTG por 3h, 5- fração insolúvel da LipW_orfW, 6- fração solúvel da LipW_orfW.

4.6. Purificação

Após a confirmação da insolubilidade da proteína, a purificação da proteína LipW_orfW em condição desnaturante utilizando uréia. Foi obtido a partir da purificação da proteína cerca de 340 µg de proteína purificada, segundo o teste de *bradford* realizado metodologia de quantificação de proteína.

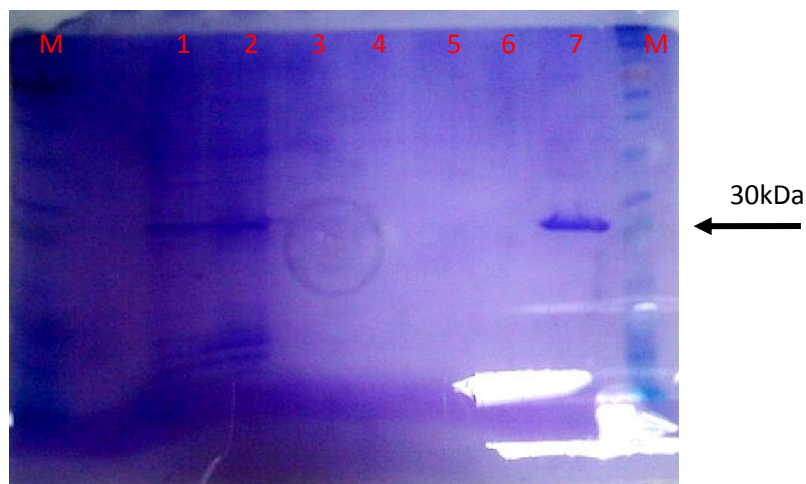


Figura 37. Eletroforese em gel de poliacrilamida. Purificação da LipW_orfW. M: Marcador de massa molecular *Page Ruler™ prestained protein ladder* (Fermentas), 1- LipW_orfW, induzida com IPTG por 3h, 2- Fração passado, 4-6 Fração lavado, 7- LipW_orfW purificada. Proteína de interesse com massa equivalente a 30kDa.

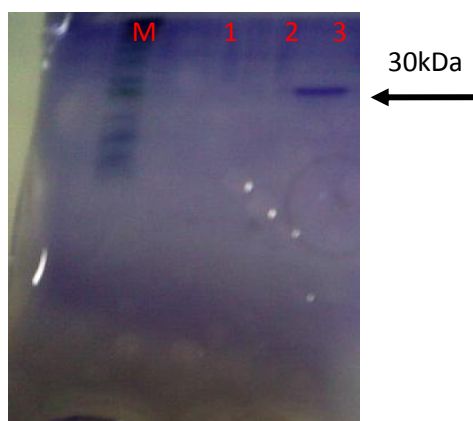


Figura 38. Eletroforese em gel de poliacrilamida. Dialise da Purificação da LipW_orfW, realizado com PBS1X. M:- Marcador de massa molecular *Page Ruler™ preinstained protein ladder* (Fermentas), 2- PBS1X, 3- LipW_orfW purificada e dialisada em PBS1X por 3 horas, trocando o tampão de hora em hora.

5. Discussão

O Clone X (Anexo I) tem 13.650 pares de base. Após análise de sua sequência, foram identificadas quatro ORFs. A ORF 1 (base 11588 a 12349), com 253 resíduos de amino ácidos codifica para uma putative glutamine synthetase provavelmente proveniente de um *Streptomyces* sp. A ORF 2 (base 4602 a 5705), com 367 resíduos de amino ácidos, codifica para uma hypothetical protein, proveniente de *Bradyrhizobium* sp. A ORF 3 (base 11453 a 12460), com 335 resíduos de amino ácidos, codifica para uma Glutaminesynthetase II que provavelmente provém de *Bradyrhizobium* sp. Por fim a ORF LipX (base 8398 a 9360), com 320 resíduos de amino ácidos, codifica para uma *lípase* que provavelmente provém de *Bradyrhizobium* sp. (Figura 18).

A sequência obtida foi submetida à análise de similaridade de nucleotídeos com o banco de dados GenBank e foi identificada como proveniente de *Bradyrhizobium* sp, *Proteobacteria*, comuns em solo, fixando nitrogênio atmosférico quando associadas a leguminosas.

O gene *LipXorfX* possui tamanho de 902 pb e codifica para uma proteína de 304 resíduos de aminoácidos com um massa molecular e um pI estimados de 32.254 Da e 10,55, respectivamente.

Motivos funcionais conservados obtidos pela análise com o banco de dados do Pfam. Motivo, Esterase_lipase ,*Abhydrolase_3*, enzimas com dobramento α/β hidrolase (Figura 39).

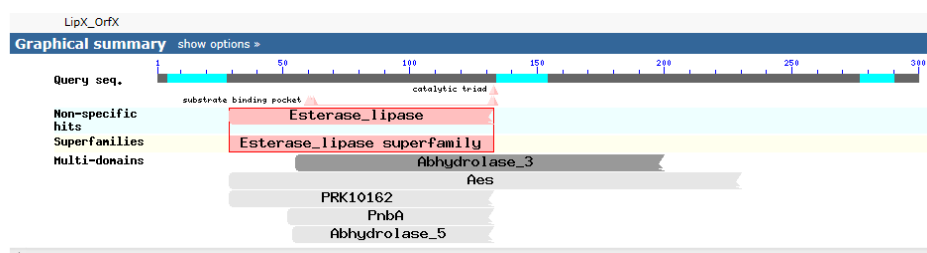


Figura 39. Domínio conservado do LipX_orfX.

Pela árvore filogenética (Figura 25), o gene *LipXorfX* agrupa com as enzimas da família IV, chamadas HSL (lipase hormônio-sensível) são família que exibem sequências de aminoácidos semelhantes aos de hormônio lipase dos eucariotos, essas sequências foram relacionadas à adaptação ao frio, embora esta família inclua também enzimas mesofílicas e termofílicas (Arpigny e Jaeger, 1999; Bornscheuer, 2002).

O Clone Y, tem 6650 pares de base (Anexo I) Após análise de sua sequência, foram identificadas quatro ORFs. A ORF 1 (3765 a 4650), com 389 resíduos de amino ácidos codifica para uma cyclohexanone monooxygenase provavelmente proveniente de um *Acidocella* sp. A ORF 2 (base 5335 a 6432), com 365 resíduos de amino ácidos, codifica para uma Folate-binding protein, proveniente de *Terriglobus saanensis*. A ORFlipY (base 1609 a 689), com 306 resíduos de amino ácidos, codifica para uma *esterase putativa* que provavelmente provém de *Acidocella* sp. Por fim a ORFlipG (base 1851 a 3020), com 295 resíduos de amino ácidos, codifica para uma glycoside hydrolase 16 family protein que provavelmente provém de *Curtobacterium* sp.

O gene *LipYorfY* possui tamanho de 902 pb e codifica para uma proteína de 306 resíduos de aminoácidos com um massa molecular e um pl estimados de 33.434 Da e 8.48, respectivamente.

Motivos funcionais conservados obtidos pela análise com o banco de dados do Pfam. Motivo, *DUF 2424*: provável serina esterase, *Esterase_lipase* *Abhydrolase_5*, enzimas com dobramento α/β hidrolase (Figura 40).

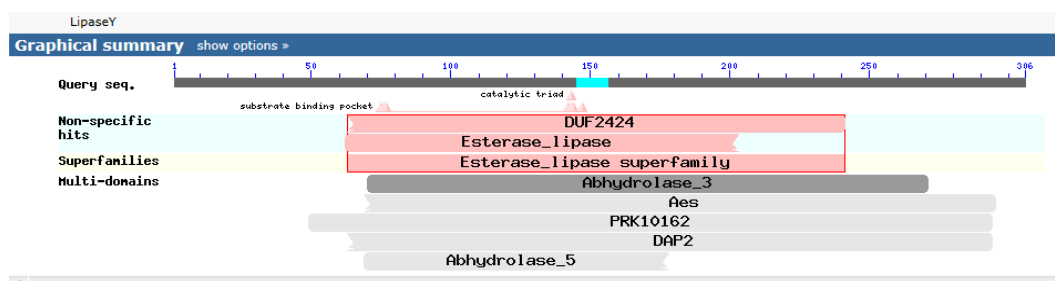


Figura 40. Domínio conservado do LipY_orfY.

Pela árvore filogenética (Figura 23) o gene *LipYorfY* agrupa com a família VII das esterases, após realizar o alinhamento com os 10 besthits (Figura 24) ele agrupa com lipases de microorganismos não cultiváveis.

O gene *LipYorfY* foi amplificado, clonado no vetor de expressão pET21a+, e superexpresso em *E. coli* BL21(DE3.). No entanto, a proteína LipYorfY superexpressa foi encontrada presente totalmente na fração insolúvel do lisado celular na forma de corpos de inclusão (Figura 30). Os corpos de inclusão são resultados da acumulação intracelular de proteínas dobradas parcialmente ou dobradas incorretamente formando agregados protéicos insolúveis e sem atividade.

Diferentes procedimentos foram testados para obter LipYorfY na fração solúvel, tais como: expressão da proteína sob baixas temperaturas (18-30 °C), utilização de estirpes hospedeiras diferentes de *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS), Porém, nas condições testadas, visando solubilização da proteína não foi possível obter LipYorfY forma solúvel.

O gene *LipYorfG* possui tamanho de 900 pb e codifica para uma proteína de 300 resíduos de aminoácidos com um massa molecular e um pI estimados de 32.254 Da e 4,84 respectivamente.

Motivos funcionais conservados obtidos pela análise com o banco de dados do Pfam. Motivo, *GH Laminarinase* , *Glyco Hydrolase família 16*.

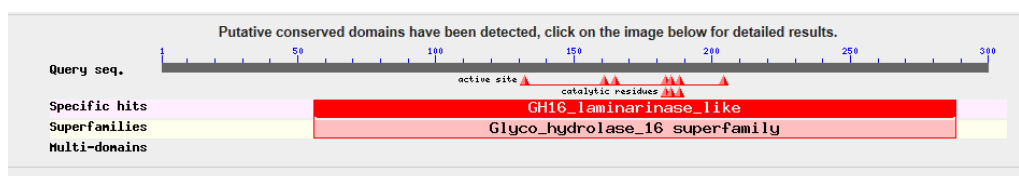


Figura 41. Domínio conservado do LipY_orfG.

Alguns trabalhos mostraram que tem algumas β -glucosidases que são multifuncionais, tendo também função lipolítica (Jiang et al., 2011).

O Clone W, tem 10.000 pares de base. Após análise de sua sequência, foram identificadas quatro ORFs. A ORF 1 (base 530 a 970), com 282 resíduos de amino ácidos codifica para uma Aldolase Classe II provavelmente proveniente de um *Ralstonia pickettii* 12D. A ORF 2 (base 1632), com a 2256) 405 resíduos de amino ácidos, codifica para uma Acil-CoA desidrogenase, proveniente de *Haliangium ochraceum*. A ORF 3 (base 3540 a 4000), com 873 resíduos de amino ácidos, codifica para uma Uridil transferase que provavelmente provém de *Candidatus Koribacter versatilis* Ellin345. Por fim a ORF4 (base 2427 a 3240), com 288 resíduos de amino ácidos, codifica para uma *lipase*.

O gene *LipWorfW* possui tamanho de 900 pb e codifica para uma proteína de 290 resíduos de aminoácidos com um massa molecular e um pI estimados de 29335 Da e 5,97 respectivamente.

Motivos funcionais conservados obtidos pela análise com o banco de dados do Pfam. Motivo, Esterases_Lipases

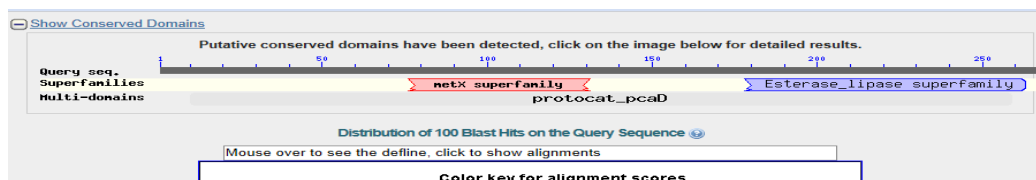


Figura 42. Dominio conservado do LipW_orfW.

Ainda usando o BLAST foram selecionadas algumas lipases/esterases que apresentavam similaridade com o clone sequenciado e representantes de cada uma das oito famílias de lipases de acordo com a classificação de Arpigny e Jaeger (1999) foram selecionados pelo número de acesso do GenBank. Usando o programa Mega 5.0 foi construída uma árvore filogenética para mostrar a relação entre essas enzimas provenientes de organismos diferente.

O gene *LipWorfW* com a Família V das Esterases (Figura 21), quando foi construída a árvore com os 10besthits (Figura 22) o gene *LipWorfW* agrupou com lipases provenientes de microorganismos não cultiváveis.

Pela análise filogenéticas s 4Orfs são diferente uma das outras.(Figura 42)

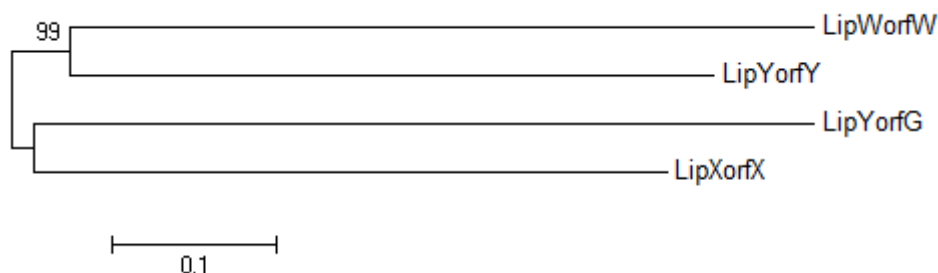


Figura 42: Árvore filogenética da LipX_orfX. A árvore foi construída pelo método *Neighbor-Joining* utilizando o software MEGA 5.05. Foi calculada a significância estatística para cada clado utilizando 1.000 repetições de *bootstrap*. Utilizaram-se as sequências proteicas das ORFs.

Quantidade significativa de *LipWorfW* induzida por IPTG foi obtida com baixo tempo de indução (apenas 3 horas), o que nos permite inferir a não ocorrência de efeitos tóxicos decorrentes da produção aumentada do produto, e com baixas concentrações do indutor. Tal fato permite avaliar a viabilidade da produção escalonada da enzima no sistema de expressão proposto, devendo-se avaliar ainda a interferência do tempo na produção da mesma, ou seja, o tempo de crescimento mais propício para que seja obtida grande quantidade da proteína expressa.

A etapa de purificação de produtos biotecnológicos produzido por células microbianas constitui uma etapa complexa do processo, dada as variadas características dos meios e das biomoléculas de interesse. Desta forma, as etapas de purificação são consideravelmente desafiadoras vez que não há processo de purificação de aplicação geral.

O gene *LipWorfW* foi amplificado, clonado no vetor de expressão pET21a+, e superexpresso em *E. coli* BL21(DE3.). No entanto, a proteína LipWorfW superexpressa foi encontrada presente totalmente na fração insolúvel do lisado celular na forma de corpos de inclusão (Figura 35). Os corpos de inclusão são resultados da acumulação intracelular de proteínas dobradas parcialmente ou dobradas incorretamente formando agregados protéicos insolúveis e sem atividade

Diferentes procedimentos foram testados para obter LipWorfW na fração solúvel, tais como: expressão da proteína sob baixas temperaturas (18-30 °C), utilização de estirpes hospedeiras diferentes de *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS), Porém, nas condições testadas, visando solubilização da proteína não foi possível obter LipWorfW forma solúvel.

Estudos de cinética enzimática se fazem necessários para a determinação das reais condições de utilização de LipWorfW, e da LipYorfY e a determinação de possíveis aplicações. O presente estudo teve o objetivo de acessar o potencial enzimático de genomas de bactérias que habitam o solo de Cerrado. Através da abordagem metagenômica foi possível o isolamento de enzimas lipolíticas que possui baixa similaridade com as conhecidas. Isso confirma a abordagem metagenômica é capaz de acessar genes e enzimas não conhecidas ou exploradas.

6. Perspectivas futuras

- Purificar as enzimas LipYorfG e LipXorfX, para a realização de estudos de cinética enzimática;
- Testar diferentes procedimentos para obter LipYorfY e LipWorfW na fração solúvel, tais como: expressão da proteína sob baixas temperaturas (16-30 °C), variações na composição do tampão, força iônica (0,050-1 M de NaCl ou KCl), utilização de estirpes hospedeiras diferentes de *E. coli* (Origami (DE3)pLysS, Rosetta (DE3)pLysS, C41(DE3)pRARE) e sua co-expressão com chaperonas (GroEL/GroES) e realização de estudos de cinética enzimática;
- Publicar em periódico científico os resultados dos estudos realizados com os clones LipXorfX, LipYorfG, LipYorfY e LipWorfW;
- Fazer triagens enzimáticas das outras bibliotecas (de grandes insertos de solo de Cerrado, de rúmen) para transesterificação;
- Aperfeiçoar estudos de espectrometria de massa como complemento para identificar genes responsáveis por atividades enzimáticas de transesterificação e hidrólise lipolítica.

Anexo I

Clone X

Tamanho total: 13,650 bp

CCAAGCTGCGAAGCTTGCATGCCTGCAGGGGAACAATTTGAGAGTATGGAGGCTTCCGCTG
GTTGGCCCCCTTGTAGGCGAAATACATCAATACCGGATCGTCACGGTAGCGTTCTTAACACGCATCC
CCTCATGGTCGTTTGAAGATCACCACAGCGATAGCAGAATGAGGCGGTCTCGATAGATCTCGATCG
CTTTGCGATGATGAAAAGAATGCCCCTGAACGATCGACACGCCTGTCTTGTGATCAGAGCCTGGGC
AAAAATCCTCTGCTCATCAGGAATGTGATTAAGTGAAAATTAGCCATAAATATCAAAAGCTTATAAACA
GGGCCCCGCTGAACAAAACGGGCTGGGTGCAACTGGGGAGCAACCGGGGCAGTTGGAAAAATTTAC
CAACCGAGCCAAATGGCTCACCTGGGCGCCCGGTGCATAGCGGGGACATCGAGCGGGCCCCGCTG
GAAGGCCTCCAGGCGGAGTGCGAGGCTCGGTCCGAGCCGGTCGAGGAGATCGACCTGCATCGCGC
GATAGATGCGGTTGGGGAGCACCCCAGCGATCCGGCTCACGACGCGCGTTGGCGATGCTGGCGCG
CGTTTCGTTTGGAGGCATGTGCTTCACGTCAATTGTCTAAAGGACAATTGTCCCCAACCCCCGCCCG
CACGATCATCGCTCGGGGTTGATACCGATGCGGGGACATCGATGCAGCCCGATATTTGTGGTTTA
TCCTGGCGCTCTTGCTTATGGCGATCCCGATTGTGCTCGTCATGTTGTGACGCGCGCGTGCCTCAC
GCGCTCAGCTCGATCACCTCAGTTGCCAGCACCTCAACCGGATGCGAGCGTTACTAGCCGGTGCCG
ATCCTTCAGCGGCGAGGACCGGCACCTAAACTCGCCGGCAGGGCTAGTGGCGAGCCTCACCCATTG
TCATCAGATAACTTGACCGCAAACACCTATCCGCGAGGATAGCATGAGAAAACACAAGGCGCGTTGT
GTAATACCACCTCCAAACCCGCTTGAATCGAGATTTTTGTGGACTGAGCGGGTGAGTGTGGTTGGTG
CAGTATTTTTTTCTTGCCCGGTATGATTGCTGGTTCGATCTGATTCCGGGGGCGAGATGATCAATGC
ACCAAAGCCGAAGTGCGGCGGCTGAAGACGGCGCTGCACTGGAAGAAGGTACCGCCGGCGCAGCG
CGAGCGCATCCAGATGGTGCTATGGCGCGAAAGCGGGATGACGCAGCCCGCGATTGCGCAAGGCAT
GGGTGTGTGCTGAGCACGGTGAACCGCGCGCACATGGCCTATGACCACGGTGGCATCAAGGCACT
CAAGCCCAAGCCGAACGGTGGACGCAAGCGCGAGAACATGAGCCTGGCCGAGGAAAAGGCGTTCTT
GGCGCGTTTTGCCAGGGCCGCCGGCGCGCGAAATGTTGAACATCCATGATCTGAAGGCTGCTTA
TGAGCAGGCGATCGGCCACCAAACAGCGACAGCACGATCTATAATCTGCTTCATCGGCATGACTGG
CGCAAGCTGATGCCGCGGCCGTTTCATCCGACGCGGACCTGAAAGCGCAAAATGCTTTTAAAAAA
CGGCTTTCTGACGTTGTGAGGAACGCCCG₉CGGGCGGCTGCCCGTCGCGGCCGGCGGCTGCGCA
TCATGTTTGCCGACGAGGCGCGCTTTGGCCGCATGAACCGGCCGCGACCATGCTGGGCACCGCTCG
GCACAAGACCAGAGGTCGCCGCCCAACTGATCCGCGAGTATGTTTATCTGTATGGGGCGGTGTCACC
CAAGGATGGGACCTGCGTCTTTCTGATTCTACCGGCGCCCGACACCGAATGCTTCCAGATATTTCTCA
ACACCGTGGCCAAGCGATATTCCAGGGATCTGATCCTGCTGTTCTGTTGACGGCGCGGGCAACCATG
GCAGTGATCAACTCGCGCTCCCCGCCAACATCATTTTGCATCCGCTCCCACCCTATTCCCCTGAGTTG
AACCCGCAGGAAAATATCTGGGATGAGATTCGAGAAAAGATCTTCAAAAATTACGCCCTCAAATCCAT
GGACGATGTCTACGGCAAGCTCGAAGAAGCGGCTCTCTACATCCAGCGCAATCCCAAGCTCGTCAAA
TCCATCGCATAAGATCTCGAGAGAGCCTTATGGCTTACGCGCCGGCTCACGACACCGGCGCTTGGCA
GAGATGTCGGCGCGCGTTTTCTGTTGCGCGGTCCGCCACCATTGTAGTGTGCGCCAATGCCCTACCG
CCCCGATCCGGCCAACATCCCAACGATGCTTATGCTTATGCCGTCATCGCCACGTGCGCCGAGCGG

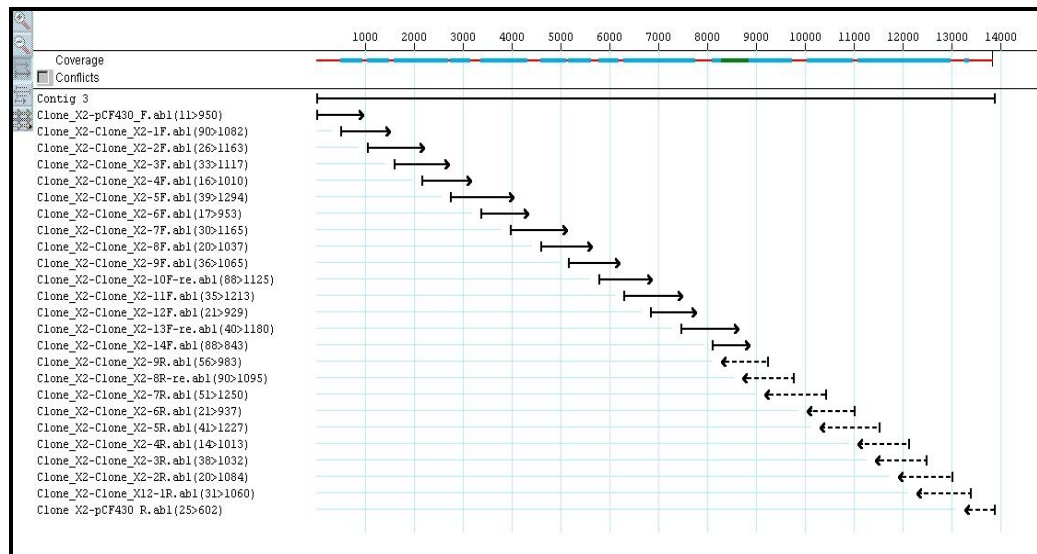
CTTGACCCCCAAGCCTGATCAGGAATTGTGTTGCCGCCTGGAGAATTGCGGGGCTTGCCGTGAAACT
GCAACTGGAATGGGCAAATCTTCTTCCGCTGCGGAATGCCCGCCGAGAGGACAACCTGATTTATAAA
CTCCAACATTTGAGATTACCTGACGGGCCGGGAGTTTATGTTTTCGGCAGAAAATTCGGAGGAAATTT
AGAGGCTCTGTATGTTGGCAAGGCGCGCAACATTCGAGGTGAGTGCGGGGGCAACTGAAGAACCT
GATGCTAGTGCTACATCTTCAGAACGCCAAGAACGGCAAAAAGGGTTTTGCTGGCGGGGAAATTTCTC
TCTAAGCCTGGACAACAAGAAGCCAAATGTCTGTCACTCTTGAAAAAGGCCCTCATTAGATACTTTCT
CTCGGAAGGCCACGACCTCGTGAAaTAGGCAAGGCACCCGGCCTGAGGCGACATGAAATCACTTCAAA
AAGGCCGAGGTGGATAGTCCCGAAATTGATGTTTCATTGACCGATCCAAAGGCGGATGACGCTACCAA
ATCTCAAGCTGCCGAGTTGGGTCTAAGCTGCGCGGGCCGACGCCTTCACGGAGAATAAATTGAAAT
CGCTTTTGGTCGCGGCTGCTCTCATCGTCACCGAGCCCGGGCGCGCCATCGATGGATTCTGCGCCC
GAGCAAGGTCAAGCTTAGACTATCCAAATCGAATCGCGCTCTTGCCAGGCTTCATCAATGGCAAGCC
GACGGTATCGCACAGCACCATAGGTTCTCGCGAGAACCATAGCGCGGCTTGAGATCGCCGATCCG
GGCGCGCTCGCAGGCACCGACTTTTCGATCCGTGCTTCGGCGGCGTGCCAGACGCGGCGAGCCGA
TGTTTCCTGCGGCCCGAGGAGAGACCCATAAACTCGTTTCAAGCGCCTTCGCCGATGGTGCCGCAA
TTTCGCGACTGTTTAACTGTGATGGCGAAAAATCTTTCGCCACCTCTGCAATGGTCCGGCGCGCCAGA
GCAAACGCAGAGCATTATCCTGCTCTGCGACGATCCCGATGCTCCCCCGGCACAATTGGGCGGTTT
ACGATATTGCGCCAGCCATAACGGAGTTCGACAGTCAACGGTGCGCAGAATTGCGGCTACTTGCGCT
TCGGTTGAAGACCTTCCGGCAAAGGCCAACGCGTCCAAAAAAAACAGTGGTCACCCCACTTTTGTCC
ACGCGAGGGTCGAAAAATCGCGACTATTGCGACCTGCCTGGTCTATCCGTCAATAAGGCGGTTGCTT
GCGCGTACGCTGCTCTTTCGCCGCTTCGACCCACCAGACAAAATCGTCGGCGAAGCGCGGAAACGT
CTTTTCAGTGCCCTTGCCGCCCTCGCCGATCGGCTTGCCCTCGGCCGAAAGCGTTTGCGCGATCGG
GCCGACCGCGATCGTGTTGACACCACGACCATGCCATTTCCGACAACGTACCGTGCCAAGCGGT
CGCGGCACGGGCGCCTGCAAAGCGGCCGCGCGAGTAGCTTGCGATCGCCGCTGGGCGCCAGAACC
ATTCCTCGAGAAAATGGTCGGTAAGATTTTTCAAACCCGGCTGAATACCCCAATTGTATTGCGCGGTG
ATGAAGACGAAGCCATCGGCGCTGCGGATCGAGCCCGGAGCTTCTCCAACGCCTCGGGTGCTGCG
CCTTTCGGATATTCTTATACATGCGATCCAACATCGGCAAGCCGACCGCTTTCGCATCGATCAAATC
GACATCGTGCTGCGAGCGCGAAAGCCATCGACGACGAACTGCGCGAGCCGAATGCCCGTCCGGTC
GGAGCGGTAGGAACCGTAGAGCACGAGAATGCGGTAGCTCATGATCGGCGCATTCTACGGCGAGAG
CGGTTTTTCATGAAGTCGTCAACGCCCTGAATTTTCAATTGTTAGGCAGCGCTGTGTCCGTGCGTC
GGCGCGGCACAAAAACGCCAAAATTCTTTTGCAATAAGTGCCTTCAGAAGGAGAGCCTCAAGATGC
GGATCGCAAGCGTGATCTTTGCGGGCTCGGCTGCGGCGCTGACTGCGCTGGCAGCACCCGCCCCCG
GCAAAACATTCCGAAGCGCAGAAGCCGACCGAAGGCGCGACCTCTTCCTACCCCTGCCATGCCTACC
AGATGGCACCCGACGGATTATGGACGCAGCTTCCCTGCCGGGAAGCGGGCGCCGCCGAGCCG
CCGCGTAAATCAGCGACCCGCGGCGGCGTTAACAACGAAACACGTTGAAGCACCGGCGGGTTGCCG
TGCGCAAAGTTTCAGACTTGCGCGAGCGAATCCATCTTTAGTTTGAGGCCCTCGATCGCCGGCTTCG
CAACGGGTGCTACGTCAGGGATTGCCATGACTTTGTGCGACATCTGGTCAATCGAAGGTCTCACCGC
GACGATCAGTTTGGCCAATGCGCTTCGTCCCTCCGGAGTAAGCTTTGCTGCCCCGCGCGCCGAGATC
GTCCAACTGGCCTATCGCCTGGTTGATCTTGGGCAGAGCCGCCTGAGCGCCAGCGGCATCCGTGAT
GCCGGGTAGCGCGGACTTCAAGGTGTGATGGACGAGTTGAGCTGGTTAGCCAGGTTACCCCCGTC
AACGGTCAACGACGCTGGCGCCAAGCCCACAGTTCCAGTCGAGGCGCGGTTTGTGCTTGCGGGG
CAAATCAGCGACTGTCTCCTCACCCCTGGCGTTGCAGGAAGTACCAGCCAAGACCGCCCAATACGATC
GCAGCAGCCAGCCAGTAAGGCCATTGCGCTGAAGGAGAGGCTGTCTGACGTGCGAAAGTGCTGGCC
CGCTCAGCCGCGCTTTCGACCCGGCTTGCTCCAGCCGAAGCTGCCGCCGCCCGCTGCGCAGCCC
GGCCTCTGCCTTGTCGATCAAACCCGCGGCGCCAAGCTGGTCAGCGAGACCCGACGGGATCGCCGA

AGTAATTTGGTCTTTCTGTGAGCGGAGCAGCGCTGCCAGGCCGTTTGCCTCGAGCCCCGCGTTGCG
CTGCTGCTGACCGAGAGTGCCCAGCACGACCGGACCAAGCATGCTGAGGAGCAACTTGCCGCCACT
ATCGCCCGTGCCTGCAAACTTACCCACCGCCTGAGCCATGGTGTCCAAGGTCCGGCCTCCGAACAAT
CCGGACAGCATGCTCGATCCGGTCTCCACCAGCCCCCTGGGGGCCAGCGTTGCGCAGGAGATCCGTG
ARACCGCCGGATTGCTGTTGCGATAACACTTTGGACAGTTGGCTCGCTCCCGCGGGGGTTGCGACC
AGTTCGGACAGGCCCGCCAGCAACGCCGGGACTGCTCCTCCCGCCGCTTCTGGGTTGCGGCTCG
GTCTAGTCCAAGAAACGAGGCTATTTTTTCGATGACTTCAGGAGTCAGAAATTGCATTGCAcAGGGAT
GTGAGATTTGCTGCCATGGCGATCTCTCCAGTTTGGTTGCCGCAAGGTCCGCCTGCTGGGGGAGCT
CCGATCTGCGGGTTGGTTAAGGTCGGCGCTACTGCCGCTCTGAACTGCCGCATGTGTCTCGCGTCA
AACGAGTCCGGCATTACCCCCGATTTCCCATCGACGACGTCATTGCCTTGCCGGGATCGTTGGGCT
GTCCATTACAGCGTGTGGAGCGCTCCCAAGTTGATCTTGGGTTTGACGACGCTTCTAACTCTGACG
CCTGTGAAAAGTTCAAATTGAAAGCGTCAACATGACTGTCTCTTTTCGATCCAACAACCTCGAGCCCAC
TCAATTTTCCCTTGGCGCCTGACGGGCGAATTGGTCGGATTTTCTTGTACCTTCGCCGGCCTGGCC
ACACGGCGTCAAAACAACCTGTTGCGCGCAAACCTTTCATCTCGCAAGCCGCTTCAAGCTGACTTGGGT
CGCCCTGTGCAAAAGGGCCATGGGTGCAGCCAGCACCCGCCATTTTCTGCGCCCTTGTGATTCTAGG
AGAGTGAAGTTCTCACAAAATCGCGCCACGAGAATGCGAGGTTTTGCTTCAACACTTCATTGCAAG
AGCGCAAACAACGACCTTCCTTGCTCGCTGCGCGAGGAGTTATGCAGGGCAAGAGTCCGCCGAAGC
GTTTATTGCGTGGGCGACAGCCGGCCCTCGATTACTTTGCGGATCCTGTCATCGGGCCGTGCTGACC
GAGCCAACTGACCCGCTCTTCGTCCGGTCCACCGTTTGGTGCTATCCTTATCACGGCTTGTGAAACA
CCAGCGTGCGCAGTTCGATGCTCTCGCGCGGGGGAGCGTCGGCAGGCGTAGTCGGATCGACAAAG
GCGGTGTGCGGGGCAAAGCGGGTGGCGCCATCGGCTGCGGAGTCGTAGCATTGAGCAGGATCGC
TTCATCAGGCGTCATCTCGGAAAAATAGAACCATCGATGGCCGGGATTGAATTTACCGAATAGGTTT
CGCCATGACGGTTCGGATAGATTAGGTGCGAGGCGACGAGATCGCCTTCTGCCACCGTTTGCCCATC
GCACATCGCAAGCGGCGTGTGCGCACCCGGTCCGCGGATCGGGCGCCACAGATTGATCACCTGTAC
GCGGCCCTGCAAAAGCTGGTGGGCCTACCCGGGCAAGTGTTGCGGCACGCGCTTCGGGCCCGACG
TCACGGTCTGATCTACATGCACGCGCGTGGCAGGCTGCCGCGTCCCGCGCCACGAATGTCCGGGG
CGCCTTCGACGCGCTTGCGCACGGTGTGGTCAAAAATAACCACGCGCTCCGCTCTCAGCGTCGCGC
GGATGAATGCTTCCGCCAGCGGATAGTAGACACGTCTCACCTCCTCGTCGTCATGGAATTCGGGAC
CACGGTCCGATGGCGGACCAGTTCAAAACCCTCGCGGTGAGCGAGAAGCTTTTTGCGATCAGGCG
GCCGTGCAAGATCGGAATGAGATGCGGCTCTGGCAAGGCCGTGATTTCGGCTCACCCGCGGGCGG
ATCGAAGGCGTAGGTGCGCGGCTTGCCGAAGGTGCGCGCGAGATAATTCAATTCGGCTTTCACGAA
GGGAAGTGATTGATTTTCTTTCCTTGCAAGGCCATGGCCACTCTCCCGAACATCAACGCTCAACTC
GATGTTTGACGACGGACGCATTGCGGCAAGTGCGCCGCCGAAAATAGCAACGTTGCGATCGTCGCAT
GGCTCAGAGGGGGAAAAATCTTGTCCGCGGCCGACGGCAGCGGAAGACTCTTTCCCGCCTCGCGCG
TTCGTGAATTAGGCCGCTTTCGGTCCAAAGGCAAGCGCCACTTTGGCGGAAATCGGCTCGCCGAGC
GCGAACAGCTCGAAGGCGCGAGCATGCCCCGAGGCGCAACGGCATCAACAGGCTCGAGGCCGCCTC
CGGCACCACCGCCAGACTGATGAAGGGCGTGGACAAAAGCGCGTTATCCGCAAGCACCACAAGATC
GCAATGCAGGAGCATAGTGGTGCCGACGCCGACGGCCCTTCCCTGCACGGCCGCAACCAGAGGCTT
GGTCAGCCGCGACAGCGAGCGGATGAAACGGATCACATGCCGCTCGATCTGAACGTTGTGGTCA
TGCTCAGTCTCCTCTGGGAAATTTGCTCTGAATGCTGGCTAGCCAACGCGCGACGACGTCGATCTCT
TCATCGCTAAATCCATCCGCAAGACGCACATTGATCGCGCGTGCCGCCCCCTTGCGCGGGCGGAGC
GATTTACGGCCCTTCGACGTCAGGAAGACACCGTGCGGTGACCCAGGCCGCTGGTCCCAGCCGGCC
CGAGGTGAGGGGCGGCGCCGCTTCGCCCATCACGATTCCATCCTGCCTGCCAAGCACGAACAGCA
GCCCCGCCTGCGCCGGCGAGACGGCGCTCTCAGAACTCGCCGTCACCGCGCGCTGCACACGCCGT

TGCGCCACGCTCAGGAGGTAGATGAGACGATGGTTCTTTCGGATGGTCACACCCGTTGCTGGCTCAA
TTATTTCTGATGCGAAATAATTATTACCCGCAAAGAGAAGCTGTTGTCACGGGAAAAGATCGCGGCCC
GAGGACACCGCAATTCGGGCAGTTGCAGGCGCGGGAGGCGGTATCTATGCTGACGGCAACCAAGAT
CAAAAAACGCCAAGGATTTCAAATGAACGCTCCGCTTGATACCGTCATCGCCCAGATCATTCCGCT
GCTTCCGTTGCGCGATCCCGAAACCATGACCCCGCAGAGCGCCCGCGATGCGCTGCGCGCACTCGC
GGCCTCGCGAGCGGGCCGTTCCGCCGCCGGCGGTGGCCAGCGTCGAGGACACCCCGGTCAAGGGC
GCTGCAGGCACGCTCGCGGCGAGGGTCTACCGCGCCACGCCCGCAGTGTCCCGACCGTGGTGTT
CTTTCACGGCGGTGGCTGGGTGCGGGCGATCTCGAAACCCATGACCGGCAGGCACGCTGGCTTGC
GATCGAGACCGGCGCGGTGCTGGTGTCCGTGATTATCGGCGTCCGCCCGAGGTGCCCTTCCCGG
CGGTTTCGAGGACGCGTTTGCCGCGCTCCGTGATGTTGCAAGCCGCATCAATGAGTTCGGCGCCGA
CGCGACGCGCCTGGGTGTGCGCCGGCGACAGCGCGGGCGGCAATCTTGAGCAACGGCTGCGATTG
CCGCGCGCGATGCCGGCATCACACTGGCCGGCCAGCTCCTTGTCTATCCGGTGACGGATGTGGCCG
GAAACTACGCCGACGCAATCGAAAATGCGCGCTTTCCTCGCGTCGAGAAAATGCCGAGGGCTATTT
TCTGTGCGCGCGGTGATGGAATGGTTTTGCGGCCATTACATTGCAGAGCACAGACATGGCACGGAT
TGCGGGGTCTCGCCGCTACGCGCCCAAAATCTCGCGGGCGTCGCGCCCGCTGTGGTCTGCACGGC
CTGGTTCGATCCGCTACGCGATGAAGGCTTGGCTACGCAAAGGCGCTGCGAGCCGCCGATGTCCC
GACCCGCTATCACGAGGGGCTTGGCCTGATCCACGGCTTTTTCGGACTTGGGGAAACATGCGAGGC
CGCGCGGATCGAGGCGCAACGCGCGCGTGCCGATTTCAAGGCCCTGCTCGCACGGGGCGCCTGAA
GCAGCATTTTTTGGTGAAGGGCGCCTTGGTGCTTGATCGCGTCAAGATTTGGGTTTCCAATCGCGG
AACTTGGCTGGTTTAGGGAGACCTCTGATGAAGAAGCTACTTTTTGGCCGCGATCGTTGTAAGCTTCG
GGCCGGCTCGGCGTTTGCGCAAGATTCATGCGAAAGCAAAGCGGTGGGCAAGGATGGCAAGCCGCT
TGCGGGGCGCAGCAAAAACCTCGTTCATGAAGAAGTGCATGCAGCAAGCGTGCGCGACCAAGGCGGT
GGGCTCGGACGGCAAGCCTCTCGCCGGCGCGGCCAAGACCAGCTTCATGAAGAAGTGCAGAGAAAG
GCGCTTAAGGGATTGCATCGTCAGCACAAAAAGGGGGCGGCCTGGGGCCGCCCCCTTCGCCATTTG
GGATGATCACTTCTTGCTTGCCTTGCGGCGCAAAGACCTGATTGGTGAAGGGTTGCTCGGTGCGCAGCCCT
ATCACAAATGAACTTGCGGCCCATCGTTTGGTGGCAGGCGTGAAGTGGCCGACCGCATCAGTGAAGT
GCGAACGTCCTTCGCCTTGATCGCATCCGCAATCGACCGGATCGGCGTCGCCAGCGTCGTGACATTC
GTGGCGGGAATCCCGGAGTACAACAGCGCGGCTTCCGACAGCCCTTCCGTGAGCTGGCGAAGTTG
AAATCGGCCAGTTCCAGTTCTGTGCCCGGCCGCGCAAAAAGAGCTTCAGATGGCGTAGCTGCAATG
TGTTTCATGATGTCACCGAGCCGCGGCGCATAGGGTTCCGCTGCAACGTCCACTCCGGAAGTGC
TTGCCAGGGGCGCCGCAAAGCAAGTCAGCAGCAGCGCCGCAATCGAAATGCGAAGCTTCATTAGATT
TCTCCAACCTTCCCTGTGTTGTCCCAATCCCGCCTGAGAGATCGCCGTATCATCCTCTAGCTCGCG
GGCCGGCAATCAATTTGCGCTTGATCAAAGGTGAACAGCACGAACGGTCGGAGACAAAGGTGCGG
AACGAAGCCACTATTGCGGAAGCGACAACCGCGATATCAAAGAGGCGATCAGCCCGGCTGTCTCCC
CCGCCGGATGCGCGTAATCGCGTCGCCTATCACGTGAAATAGGACTTCTTTGATGCTAAAAGCACAG
AGTGGTGACGAGATTGCCGCGCTTGTCTTGAGTACCAGCGGGCATTGCATGCGTTTTAGCGCAGTC
TTCGCCGCCTCGTCGCCGAGATCGGCAGCCCTTTGATAATAGGCCTTGGCGGCTTCCGCATCCTTCG
GCCCCGCGCGGCTTCTGCGCAATGCACCCATTGCTCCAGCGCGCCCGGGTGGTTCTGCGTCG
CAGCCTTCTCGAACAAGGCCCGGGCACCGACCTCGTCCTTTGGCCCGCCGCTGCCTTCGGCCAGCA
TCAGGCCGAGCTGATATTGCGCTTCCGCGTTGGTTTTGGCGGCTTTCGCAAGTAGTTGCGCGCTCG
CGCCGGATCGGACGGCGCAGTGCCGCCGCCGAGTGCCGCGAGATTGAGACCCCGCGCGGGTTGC
CGCCCTCGGCCGCGCGCTCGAACAGCTTGCGGGCTGCGCTTCGTCCCTGGAACACCGGCACCTG
TGCCGTACGCAACGCCCAATTCGACCATCGCCGAGGTGATCCCTTGTCCGCCGCTTGCGCCAGG
TAGCGATTGCCTCCGCGGTCTGCTGGTTCGCGGCATAGGCACGACCAAGTTCGTACATTGCCCGTCG

CGAGACGGGCGCCGCCCTTTCTGCAAAATTTGATCGCTGTCGGGATGTCGGCCGCCGCAATGTCCGT
GACGCCCTTGACGTCGGCGGGCTTGTCCGGGTCGGAAGGGTCGGCTGCTATGCGATCGCAAAGCAC
GAGTTCGGCAGATTGCGCGTGGGCAGACGTCCGGCGCCACGCAGCCGCAACCGCAGCGAAGCCAA
GCGTGCAATGCCATTTGGTCATGATGATCAGAAATTGCTTCGCCGCGGAGGCAAATTC AAGGCCCGC
GAACGGTCGCCGCAAACCGAGCGCCACAAAAGCAGTGATCCGCCGCACCGCTCCACGCTCCGGCG
GATCATATGATGGCCCGGTCCCGTACCGCCCGGCTTACGCCGCAGCCTTTGCCCGGTTGGGACCG
TCGCGATGGTCGTGTCAGGATTTGCGAAGCGATCTGGTAGGGGTCGCCCTGCGAGTTCCGACGGCGAT
CTTCCAGATAGCCCCTGTAGTTGTTGTTGATGAAGGAATGCGGTACGCGGATCGAGGCACCGCGGT
GGCGACGCCCCAGCTGAATGTGTGATCGAGGCTGTCTCGTGCCTGCCGGTCAGGCGCATGTGGTT
GTCCGGGCGGTAGACCGCGATGTGGTCGGCGCGGGCTGTCTTGAAGGCTTCCATCAGTTTCTCGAA
ATACTGCATGCCACCAACTTCGCGCATGTACCTGGTCGAGAAGTTGGAGTGCATGCCGGAGCCATTC
CAGTCGGTGTGCGCGAGCGGCTTGCAATGGAATTCGATGTGACGCCGTACTTTTCGGTGAGGCGC
AGCATCAAATATCGGGCCATCCACATCTGGTCGGCGCGGTGCGGGAACCCCTTGCCGAAGATCTGG
AATCCCACTGGCCCTTCGCGACTTCGGCGTTGATGCCTTCGTGGTTGATGCCGGCGGCGAGGCAC
AGATCGAGATGCTCTTCCACCATCTTTCGGGGCGATATCTCCGACGTTCTTGTAGCCGACGCCGGTGT
AGTACGGGCCCTGCGGCGCAGGATACCCGCTGGCCGGGAAACCGAGCGGGCGGCCGTCCTTATAG
AAGAAATATTCTGCTCGAAACCGAACCACGCGTCGGGATCGTCGAGAATGGTCGCGCGCTTGTTGG
AGGGATGCGGCGTCTTGGCGTCGGGCATCATGACTTCGCACATTACCAACACGCCATTGGTACGTGC
GGCATCGGGATAGACGGCAACCGGCTTGAGTACGCAATCGGAGTTGTGGCCTTCGGCCTGCATGGT
TGAGGAGCGGTCGAAGCCCCATAGCGGCAGCTGCTCCAATGTCGGGAACGAGGCGAGTTCCTTGAT
TTGGGTTTTGCCGCGCAAATTCGGTGTGCGCGTGTATCCGTGACCATATATACTCGAGCTTGTA
AGTCATTGAACCTCTCTGTTGAATAACTTCGAAGGTGGGGAACCGAAGGGAAGTGGTCGCCACGTG
CGCACCCGGCCACGATCGGCCGCTTGTCCCCTAGCATTTTTCGTGCCAATCGAGCCGAAGGCGCG
CCCGACCGCCCAGCGTCGTGCCCCGGAGGTGCGTCATAGGAGCGCGCCCCGGACTTTGAAGGGAA
GGCGAAAACGTCAGGAATAGTGCCAGATTTGCGCCTGATTCCGAGGCAGCCACCSTGAGCGGTACCT
TCTCCCGATTAAGACAGCGGCAGTTGCCAGCAAGATTCGGCAAGCCTGCCCTGGGGTTCCAGCAACC
TTCGGAGAGGCTCAAGCGTTACTTACACGCGCCCCGTCCCAGGGAAGGCAACCCGTGAATTGCCTAT
AAAATGTACGGCAAATGATTTTGATTCAATCACATTGCATCCTTGAGAGCACCCGCCGATACCGGAGT
TGAAACGAGTCGCGGGCACCGCACGATTGACGGGTACGCGCCGCGAGAAGGAGTGTGCTGATGA
CGAGGGGTGTGCAGGAGTCCGCCAAGATCTACCAATTCGACGGGGGGCCGTGCTGCGGCTCTC
GGCGATCGTCGCGACGGGGAGACCAAATCCCCGGTCGACCTGAATTCGCTTCGGGTGAACGAAGCG
CTATGCAGCGACAACCTGGTACCACGAAGAGGCCATTCAGGAGTCGAACCCGGCATGGGAGCGCTGA
TGTGAGCGATAGCGTTGAGCGCTCGCTCCAGGGATCCGGACAGCGAGATACAAAAAGGGCCGAAAC
GATTCGTTTCGGCCCTTTTCATCTAGGAAGAACTGACTTGCTCGGAGCGTGCCACAGACTCCCCTG
GCGTGCCACAAGCGCGGTGAGGCGGCGAGCGGGGTGAGTTCCACCACGTAACCGAGATCGGCCAG
TCGTTTGACCAGACGCTTTTTTTGCTGGTCTGTGGAGCGGCGATCGAAGTATTTGCGGCCGAGGTCC
TGGTAGATCGTTCCATCCTTGAGCATGTGATAGATGGCGGTGAGCATCGAGGCCGCGACCGCGAGG
ATCGCCTTCTTGTGCGCGGCGAGCCCTGATGCGGAAGAATTGTGCCTGAAGGGCGACTCTAGAG
GATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCAGTGCCGTCGTTTACAA

Contigs Clone X



Clone Y

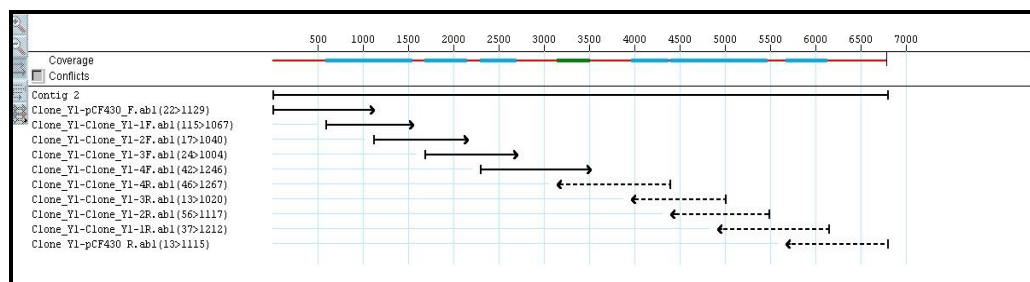
Tamanho total: 6,650 bp

TTGCATGCCTGCAGTATCCGGAAATTTGAGTTTTGAGGAGGCGGCCCGCCGTGCCATTGGTG
TTCCAGACGGCGTGGCACATGCTGGTGGCGCGAGCGGAGCTGCAACCCGGGGAGGACGTTCTGGT
CCTGGGGGCGGGAAGCGGCGTGGAAGTGGCGGCGATTCAAATTGCCAAGTTTTTTGGGGCGCGGGT
GATTGCGACCGCGGGGTGCGATGAAAAGCTGCAGAAGGCGAAGGAGCTCGGAGCGGACCATCTGAT
CAATCACAAGACGCAGAAGATTCGGGACGAGGTTGAGGAATCACGAACAAGAGAGGTGTGGACGT
CGTTTTCGAACATGTGGGAACAGCCACCTGGGAGGACAGTATGGCAAGCCTCACGACGGGAGGGCG
GCTGGTAACCTGCGGCGCGACGACGGGCTATGAGGCGAAAGTGGATTTGCGGTTTCTGTTTAGCCG
GCAACTGTGCTGATGGGATCGTACATGGGGACCAAGTCCGAGCTAGAGAAGGTGATGAAGCTGGT
GGCGGCGGGAAGGCTGAAGCCAGTAGTGGATCGTGCGTTTCCGTTGGCGGAAGCAGCAGCCGCGC
ACGGGTATCTGGAGTCGAGCTCGCAGTTCGGGAAAGTGGTGCTGCGTGTGGGGTGATATCGTCCGC
GCTCGCGATACGAGGAATTGGTAGGAGAGGAGAAAATGGCGAGCTGGCAGGCGCATCTTTCTGTGT
GGATCGTGAAATGGCGGGTGAAGCGGCGGTTGCGCGCGGTGCGCGATTATCGCGTGGCGCGAAAG
ATTCTGCGGCCGATCCCTACAAAGTTCTCAGGAATGTGCAAATTTCCCCGGTGCACCTTGGCGGCG
TGCCTGGGGAGCGGTTGCAAACCTCTAAATCCACCGAAAACGTATTGCTGTATCTGCACGGCGGAGG
ATATTTTGGCTGTTTCGGCGGAGACACACCGCGCCATTACGGCATTTCGCGATGGAAGACTTTTCATG
TGTTTTCGCCGATTACCGGTTGGCGCCGAAAATCCGTTCCCAGCGCGCTCGAGGATGCAGTTG
CGTTTTACCGTGCGTTGCTGAATCTAGGGTATCCGCCGGACCGGATTGTGGTGTGAGGTGaATCGGC
GGGCGGGGATTGGTACTTTCCATGATGCTGTGCTGCGCGACGAAGGAGTGGCGCTACCGGCCG
AGCGGCGCTGTTTTCCCCGTGGACGGACCTGGCAGCAACTGGCGAAAGTATCCGGAGTAACAACGA
GAAGTGCGCGATGTTTGAGGGAGCCGGAGTTGCCTATTCCGCGCGGTATTATGTGGGCGAGATGGA
CGCACGAAACCCATTGGTGTGCGCTCTCTATGCCGATTTCCAAGGATTGCCACCCTTACTGATTCACG
TAGGAGAAGATGAGGTGCTGCGAGATGATTCGACGCGGCTCGCCAAGAGGGCGCGCGCCGCGGGC
GTCCCGGTGGACCTGAAAGTGTGGCCGGTAGTGCCTCACGCCTGGCAATTGGCGCCGCATCTGATA
CCGGAGGCTCGGCAGTCGTTGCAGGAGAGTGCGGCGTTCTTGAGGAAGCATCTCCCTTCGGCGGTT
GCGGAGCAAGAGGCGGTAGCGCGGTGATGGCGGAAGGGAATCTAATGACCGCGACAGCCTCGGCC
ACCGCTGTGGATGTGTTGATTGTAGGCGCGGGTTTTTCCGGCATCTGCATGGGAATCaAGTTGCTCG
AAGCTGGAATGAAGTCGTTTTGATCATCGAGAAGAGTCCGGAATCGGAGGGACTTGTTGGGAGAA
CCACTATCCGGGCTGTGCGTGCGACATTCCATCACATCTTTATTCGTTTTCTTTGAGCCTTCAACGG
AATGGACGCGGATGTACCCGGGTCAAACCGAGATTCACCAATATCTGAAGCGTTGCGTGGAATAA
CGCCCTTGgCGGCACATCTgGCGGTTGAACAGCAGGTTCTCTGAGGCAGTGTTGGATGCCTCCGCG
GGGGTGTGGAACGCTAGGACCGCGGATGACTCGCGCATTGCGGCACAGGTACTTGTCTGGAATG
GGCGCGCTGCACGTGCCGCACTATCCAGCGATTAAGGGGCGGGAGAGGTTTCAGGGGCCAGCGTTT
CATTCTTCGAGCTGGAATCACAGCGTAAGCCTGGAAGGGAAGAATGTCGCGGTGATCGGAACCGGA
GCAAGTGCAGTTAGTTTGTCCCGCAAATCGCACAGGGGCGGGGAAGCTAATGCTGTTTCAGCGGA
CCCCGCCGTGGATTGTGCCGCGGATGGATTTTGCTTTCAGCGACAAATGGAAAAGCCGCTTCCGGAA
GTTCCCAATTACGCGATGGACGCTGAGGCAATACATTTTCTGGCGGCAGGAGTTTCGTGTGCTTGGG
TTTTTGGGGAATGAATCGGTTGAAAGAAGGCGGAAGAGATATCGATCCGGCACATGAAGCGACGGA
TTAAGGATGCGAAGCTACGCGAGGCGTTGACGCCCAAGTATCAGTTAGGATGCAAACGAGTGTTGGT
TTCCGACGATTACTACCCGTCGTTGAATAGACACAACGTCGAGCTCGTTACCGAGGGCATCGAGGAA

ATTCAGGAGAAAAGCATTGTACGAAAAGATGGAGTAGAGCGGCTGGCGGATGTGCTGATCTATGGGA
CGGGCTTTCGCGCCACGGAGCCGCTGATTGGTTGCCGGGTGGTCGAAAAGACGGCTTGAGATTC
ATGACGCCTGGAAGCGACGGATGTCAGCCTACTTGGGAATCACCGCGAACGGCTTCCCACTTTTT
CATGCTGCTTGGGCCGAATACCGGTTTGGGGCATAACTCCGTGGTGCTTATGATCGAAGCGCAGGTG
CGATATGCGGTGGCATGCATAAACCTGATGCGGCGCAAGAAGCAGAATGTGCTGGAGGTGCGAGAG
GGAGTGCAAAAGTCGTTTGTGGAAGAGATTTACCGGCGGATGGCGGGCACAGTATGGCAATCGGGC
GGCTGCCATAGCTGGTATCAAGACCAGAAAACCGGGTGAGGTTACGACTCTTTGGCCCGGATCGGTG
GTCTCTTATCTACGACGCACTAAAAGCGTTACCGCGTCCGATTATGAGTTGACCACGCGCAATCCGG
CAGACTGATTCTCCTTCGGCGCTGCTTCTCCGAAGTGAATTTGTTTCGAAGAGCGCCCTGTGCGAAA
ATAGCGGTGACGGCAAACCTATGAGCACTGCACTCGGCAAACACGTCACTTTGACCAAACCCGACGAT
TTCGGGAGCTTGCTAGAAGACGAAGGAATCATCTTACGACGCTGGATAAAGCCGTGAAGTGGGCGC
GCAAGAGCTCGATCTGGCCACTCGGATTCGGACTGGCTTGCTGCGCCATCGAAATGATGTCCATGGC
CGCGGCGCGCTTTGACGTTGCCGTTTTGGAGCGGAAGTGTTCGACCCTACCCCGGCAAGCGGA
TTTGATGATTGTGGCCGACGCCCTTTCGAGAAAATGGCGCCGTCATTGCGCAACTCTACGATCAA
ATGCCCCGAGCCGAAATGGGTGATTTCCATGGGGGCATGCGCCACTTCGGGTGGAGTCTTCAACAATT
ACGCCATCGTGAGGGTTGCAACCAGGTCATTCCCGTGGATGTTTACGTTCCCGGCTGCCACCGCG
GCCAGAAGCTGTGCTTTATGCGATCCTGCAACTGCAAAAGAAAATTGATAATGAAAAGGGTTCTTTCA
AGCGCGCTTTGAATCTCGCCTAATTCTTGTTTCGAACCTCGGCGCATGCGATTCTCTCTCAAGTTGAA
AGCAGTAACCCATATTTCGTCGGTCATGCTTGTCCTGTAATCATTGGCATAGCACCTCTTTTATTGAG
TTGCGGCAGCGGCGCCATGCTTCGGCCTCCAGCACTCGGCGGCTATTGCTGGTATGGAGTGACGA
ATTCAGCGGTGCGGACGGAAGTTCCCCGACCGTTCCAAGTGGAGTTTTGACACCGGCGTTGGTG
CAACGGCTGGGGCAATAACGAACTCGAAACCTACACCAATCGCACGCAAAACGCGCAAATCAAGGGC
GGCAACCTTGTCATCACGGCGATGAAGGAAACCTACGCGGATCCTTCGACGGCGTAACGCGGAAC
TACACTTCAGCACGACTCAAAACCGAGGGCCTATTAGTCAAGCCTATGGGCGCTTTGAGGCGAGCA
TCAAGATTCCGGCCGGGCAGGGGATGTGGCCGGCTTTCTGGATGCTGGGCAATAACATTCTTCCGT
TGGCTGGCCCGATTGCGGGGAAATCGACATCATGGAATATCGGCAATGAGCCGGGTATCGTGAC
GGATCATTACACGGTCCCAGCACCGTCGGCCCAACCAAGTATGCCACTGCGCCCTTCAGTCTGCCC
GCCGGGCAAAAGTTTTGCCGACGCAATTCATCTCTATGCCGTGCAATGGGAACCCGGCACCGTGCGTT
TCTACGTTGATGCAAATCTATACGCCACATTTACAAGCGCGGAGTGGCCTGCCGGGGGACCTGGAC
CTTCGACCATCTTTTTTTCATTATTCTGAATGTGGCTGTGCGGTGGCAAGTGGCCCGGCTCACCAGACA
GCACCACGGTGTTTCCTCAACAAATGCTGGTTGACTATGTTCTGTGTTTACACCAAGCAATAATCTTTCC
GGCGACCTTTTCTGTGCTCCCCGTTCCCTGTGTGTTAAACACAGCCGTGGCCTGGTGGCACGCCA
TTTAGGCCGAGTTTATGAATCGTTCCCGGAGTTTTTGGCATGACCCAGCCCAGCGATGACAAGAGA
CAGCTTCTCCGTCATACCGTTGCCACCGTTGCGTATCGCGGGGGCAAAGCTCTGCGGGATGCCCT
GCGCATTTTGCGAGCTTCCATATCGGTGACAAGACGCGGACGCCCGGCCAGATCCTGTGCGACATTG
GAGATTTGTTTGACTGGGCGTTGACGATTGCGAAAGGGCAACCAGCCTGGCCAGACTCCAAGCCGTT
GCCGTGGAAGCGGAAGTCCAACGCTTTTTTCGCTGCTGTGAAGAAGTTCGATGATTTCTTGCTTCCC
AAGAGCCCTTAGAGGGCTCTGCGGAAGGACTGTTTCAGGGGCCGGTGGCAGATGCTTTGACACAG
TCGGGCAGATCGCCATGCTGCGGCGCCTGGCGGGATCGCCATAAAGGGTGAGAACTATTTCAAGG
CAGATATCGTTGACGGGCGTGTGGGGGATGAGCAGGCAGCGCCGCGGCGCGAGTTTGAATGAAGC
GCGCCGCGTCCATAACCAACTCGGAAGGTTTCAGGTGGCCGAAAGAAAACGGGCCTACGTTTAGCT
TCGGCCAGCCTACAACAGGGTAGCGGTACCGCCGGCCATTTCGAGGACCATGGCAGGAGAGATGGC
CTCTCTGCGCACGTAGGCCATGCCAAGAATGCGATCCGGGTCCAGGAGCGGGCGTAGCGGGTAAC
AAAACCTACCTCTTTGCCGTTCAACAGCAGCACGTTTTCTGGCGCAGGTGGCGAATCGCCAGAGAAA

CTGAGCCGCACGCGCACGCGGTTGACCTGGCCGCGCGAGCGGACACGCTCGACAATTTcTTGACCG
 GTGTAGCAGCCTTTGGTGTAAGTATGATATGGCTATCCTGTAAACCCGCTTCGTGGGGAATCTGCTTTTC
 GCCGAAGTCGTAGCCGAACCATGGGACATTCTGAACAATCCTCGTTGCACTTATGGCCGCGTATCCG
 GCGGGACTGCCGCCAAGCTGCTTTGCTGCGGCCAAGAGAATCTGCCAAAGCTCTAGGAGTTTTTCCG
 TCTGCACGAGAAATTCACGCTGGAATTCGCGACAGAGAGAATTTGATCAGAGAGCAGGAGATGGA
 GCCAACCGTCGCTTCCTGAAGGGCGAATTCTGGCGCTTCAGAAAGGTCTATGCCGGAAAGCTCTTTG
 ACGATGGTCATAGCCTTAGGGCCTTCGAGAGCGAGGGTCCCGTAGCGCGCTGACTCGTCAGTCAGC
 GTGACATCATCCATGATGATGATATTTGTCGAGCCATTTCGATTAGCCGTTTCGCGAATCATCGAATAGGA
 AGCGCAAAGAATACGATCTGGAAAGGCAAAGGCAGCAAGTTCAGCCAGGATGTGGCCCTGGGGGTT
 CAGCAAAGGGAGATGTTGCCGCGGCCTGGCGCCAGGTCTTTGATGTTGTTGGTGAGAATGGCATTG
 AGATAGCGGACGCGGTCGGGGCCGGTGAACGACAAATACGCACGATAGTTCTTGTGCATAAGAGCG
 ACAGTGTCCCGCGCGGCCCGGAACTCGGAGGCCGAATCGCCGAAATGACCGGGCAGCGCGCAACC
 GAACCAGGTGCTCATGCTGGCTCCGGACGCTTCGTGAACAGCGGCAAGCGGGGTAGCAAGAGATGG
 AGTCGGCGCAGTCATGGTCCTTTTACCAGTTGAGTTCCGCATCTGAGTTTATCAGACCACGAAAATGG
 AGACTCGCTTGC GCGGTGGATGGCAGACTGCCGATGGTATACTTTGCTCATGAATTACAGCCGGCCG
 GCTCTACCGCTGCCACGAAAGCTTGATTACATCACTATCCCGGTGGGAATGCTGCAGGTCGACT
 CTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCCTACTGGCCGTCGTTTACAAACGTCGGAC

Contigs Y



Clone W – Sequencia parcial

CCACATACTTCATACACCCTTCCCTTCGGGGTACGTCGAGCTCGCGAAAGCTTGCATGCCTGCAGAA
TCACAACCGTAGCGCTGAGAGAAATTCGCGCCACCCATCTGAAAAATCAATCCAGCAGGTCCGGCT
CTTGGTGAATCACC CGCTAAAATAAGGTTGCGCCTGAAACCACCCCGCAAGGTGCGACCCGATCTG
CTCGCGTGTCCCCGCCGCTTCGCGTGATCGATTTTACCCGGTTCTCCCGCCGCTCCGCCAAAAGC
TGCGCATGGCAACTCCGATCCATCGCAATAAACCAACACCGCTTCTTCCACGCTATGCCCCACGGTG
AGCAATCCATGATTCCGCAAAATCACCGCCTTATATTGTGCAAGCGCTTGCGCGATGCGCTCTCCCTC
CGAAGTCTGATAAACCACTCCCGTAAAATCCGCGAACACGCTGTGGTCTTCATAAACGCGCACGAAT
TGCGCTAATCGGATCGAGTGCGCCGCCCGAGCGACGACCATGCCTTCCCGTGCGAGCGAATGCGAATG
CGCCGCCGCGATCACATCCGGCCGCGCCGCGATGCACTTGGAATGAATGGCAAACGCCGCGCCATT
CACCGGATACTTTCTTCCACGACTTCGCCCTTATCGTTACCAGAATCAAATCGCTCGCGCGAATCT
CCCCAAAATGCACGCCAAACGGATTACCCAAAAAAGATCCAGCCGCTCCGGATCGCGCGCCGTAAT
GTGCCCCGCCACGCTTCATCGAATCCATATCTTGAAAAAGCCGGAACGCCGCCGCGCCAGCCGCTG
CTTGCGGTGCAGCCGTTCTCCGCGGGCGAAGTAAACGCCGGTGGTTTCGGAATATTCAATACATTT
GCCGGTGTGCTGGCATGAGTCTCTCGAATCAAACTCTCAGCTATACGGCCGCGCTCTGCTTC
GCAGCTTTCTCGTGCTGCTTCAGCTCGAATTCGCGATGGATTCTGCATGAACCTCGTCTGGCCCATC
CGCCAGCCGCGAGCGTCCGCACGCTCGCCCAAGCGCCCGCAAGAAAAGTATCCTGCGAAACGCCACT
GCCTCCATGAGCCTGAATGGCGCGGTCCAAACACCGACACTTTTCGTTCCGCCCCACCAATTTTATCAA
TCCCACCTCGCTGCGCGCCTTTTCTGCGTACCGTTTCCATCATCTACTTTCCGCTCAACGTTACGC
GCCGCGTCTGTTCCATCTCCATAAGCCAAGCCGCGTTGTCTGATCGTCTCCTCCCCTGCTCTGCCAG
CGGCTTTCCAAACGCCACCCTCGAACGCACCCGCTTGACATCGAACGCAACCCGCGCTCCGCCAC
TCCAATGCACCGCATGCAATGGTGAATGCGGCCCCACCCAGCCGTCCTTGCGCAATCTCAAATCCG
CGCACTACACCAAGGAGCATGTTGCTCCCGCCTCCCGTACATTCTCAAATCAACTTCGGCCGGGC
CGCGCGGCGTGGTATCCTTACAAGGCAAGCATCCGCACCACATTACGCCCCGCGCGTCCATCGGC
ACCAAAATCAACGCATGGATTTTTGTTTTGCCGCGGGGGGGTTCGGTCTATCATAATGACAATCTTG
CACCGCGGATCGCCCGCCCCGCCGACCACTTTCCGCCGTTAATGACGTACTCATTGCCCTCG
CGCCGGATGCTTGCGTGATATTCGTGCGTCCGAGGACGCCACTTCGGGCTCGGTCATCGAAAG
CACGACCGAATTTGCGCTGCCAGCAACGGCGTCAGCCATTTTCTTTTGTCTGCTGTGCCATACCG
GGCCAGCACCTCCATATTTAGTATCCGGCGCGGAACAGTTGAATACTTCGGCGGCCATGTGGCTCC
GCCCCATGATTTGCGAGAGCGGCGCATATTCGAGATTCGTCAGCCCCGCCCATTTTCATCGTTCGG
CAAAAAAGGTTCCACAATCCTGCCGCTTGCGCCTTGCGCTTCAGCTCTTCGATGATCCGCGTTGGC
TTCCAGCGGTGCGCGCGATCTCCTCCTCGAACCGCCGCTCGTTCCGGTAACATGCTCGTCTATGA
ACGCCTGCAACCGGCGCTGCCAGTCTTCGTTTTTTCGCTGAACTCAAATTCATCTT*GGCCGCC
ATCCGCTCTCGTGCTTTTCGCTTCATCCCTTGG*CAGGATGGACGCGATTATATACAATCCTCGCCGTG
TTAGGGCCTTTCATCTG*TTAGTGACTATTATGATGTTCTGTTGCGGTGCGGCCAGCGCTTCCGCGGC
AGTGCAGTAAAAGAAATCGGTAACGGTAGGGCAGGGCTTGCCCCCTCCCGATGAGGAGTAGCAATGG
CATTACAGCAAAATCAGGGAGCGAAGATTTATTGGGATGAACAAGGCTCCGGCGATCCCATTCTCCT
CATTATGGGCCTCGGCTACTCCTCCGACATGTGGCATCGCAGCCGCCCGGTCTTGCCGCGCAATA
TCGCACCATCGCCTTTGACAATCGCGGCGTAGGCCGACGACGTTCTCCCGGTCTTACTCCATG
GCCATCATGGCTTCCGATGGCGCCGCTGTAATCGACGCTGCTGGCATCGAGCGCGCCCATGTGTTT
GGGGTGTCCATGGGCGGCATGATCGCCAAGAAATTCGTTCTTCAATATCCAAAC*GCGTTGTTCTTT

GGTCCTGGGATGCAAC*GCTTCCGGAAGTTCCCAAGCCGTGGGTGCCGAAGGCGCAAGAACCTGCA
AGCCCTGACCCGCCGCGGCCAGTCCCAAGGAAGCCACCGAAGCGATCGTTCCTTTTATCTACGAT
CCCGCCACTCCCCGCCATCTCATCGACGAGGACATCAAAATCCGCTTGCAATGGTATCCAACCGCGG
AAGGCTACATGGCCCAGTTGATGGCCATCTTGAATGGGAAGCCTACAGCCGCATTTACAGATCAC
CGCTCCCACGCTGCTCATCCACGGTGAATCCGACCGCCTCGTCCCCGCCGCAAACAGCAAACTCATC
GCCGCCCGCATCCCCGAAGCAAAACTCGTGCTCCTGCCCCACGCCAGCCACATCTTCTCCACCGAC
CAGCCCGCCGCAACCCACCACGCCATCCTTGACTTCCTTGCCGCCAATCCAATCACAAGCAAACCG
CGAAGCCTAACCGCCGCGCATCGAAATACCTGCTGCAACTTCCCGGAATACGCCTGTAACCTCTC
GTAGTGGCGCAGCTTGCTGCGCCCCCTCACCGAATTGTTACAGGACATGGCCGCCTTACAGAAACAT
GGACCGCCATCATCGGTTCAAGCCGCACTCAACCCCCGCCGCACTCAACACCCATAACCCACTTGTA
ATCTGGGCAGCGAAGGACCTCAACTAATCCATATCTTGTTACTAGCGGGATTACCCGAGCGTTCCTTG
CAGCACTTCTCGCAAAAGCTCCTGCTTCCGTTCTCCAAGTTTCTTACCCTGTTGGTGCAGATAAAACA
CGTCAATCGCTTTTTCCCTTCGGTATCCACCAGCGCGACTTCGATATTGCACCCGAGCCGCGCCAG
CGCCGACCCAATTTCATAGAGCAATCCCGGATGGTCCTGCGCCGCAATCTCCATCAACGTGCTCTGC
AACGACGAGTATCGTCGAAGTCGATGCGCGTCGCCACTGCCACCTTGGGTGTCCGCCCGCGGCTCG
CGCTGTGCGGGCCTCGTAGCAGCGGCTCGAGGGGCGCGACGCCGTTACCCACATCCGTCAAGCTTT
TGCGGAAACGCACCACTTCGCTGGGATTCAACTCCAGCGTGTGGTGCAGGTCCACAAAATGAAATGT
GTCCAGTACCACCCCGCGCGCATTGGCAAACGCATCCGCCTTCAGAATGTTTCATCCCCCATCCCGCG
AGCGCTCCCGCGATCGTCGAAACAAAGCGGGGCGGTCTGCCGTCAGCAGGTGAGCGAAAGGCTGT
GGGGTGAGCCACCATCCTCTCCTCTTGCGCGGGCCCGCCAAGCATCCCCCGAACAGCGAGAAGGG
CGCAACTTTCGCCGCCGCATGTTCCACCGGGTATCGGCGCGGAAAGCCTTCGAGGAAACGCCCCAT
CTCGTGGACGCTTGCGCCGCCCTTCGTCTCGTGCCGGTTCGCGGTCCAGCGTTTTGCTGAAGAAGTT
GTACGACGCCACGAAAAGATGCCACAGCATTTCCGCTTTCCATGGCGGCAGCACTTCCGCCTTACC
ACGTCGATATCCGCGTACGTTAGCAAACAGAGTCGCTGCTACAGCTCTTCTGTCCCGCCCGTCTCGG
CAAACCCTGATAACGTGCCCGGATCATAAATGTGCTCTCGCTGCATGGTCGCGGACATATCCAGGTG
GTGTTTCGATCAGGAAGTGTAATTCCGCTTTTTCTTCCGGCGGAAGCTGCAGGCATGCAAGCTTGCG
TAATCATGGTCATAGCTTTTT

Anexo II

>LipX_orfX

MTPQSARDALRALAASRAAVPPPAVASVEDTPVKGAAGTLAARVY
RATPAVSPTVVFFHGGGWVAGDLETHDRQARWLAIETGAVVVSVDYRRP
PEVPFPGAFEDAFALRDVASRINEFGADATRLGVAGDSAGGNLAATAAI
AARDAGITLAGQLLVYPVTDVAGNYADAIENARFPSRRENAEGYFLSRAV
MEWFCQTAITLQSTDMARIGGSRRYAPKISRARPLWSARPGSIRYAMKA
WPTQRRCEPPMSRPVSRGAWPDPRLFRTWGNMetRGRADRGATRACRF
QGPARTGRL

>LipY_orfY

MASWQAHLSVWIVKWRVKRRLRGVRDYRVARKILRPDPYKVLNRN
QISPVHLGGVPGERLQTPKSTENVLLYLHGGGYFGCSAETHRAITAFFAM
EDFHVFAPDYRLAPENPFPAALDAVAFYRALLNLGYPPDRIVVSGESAG
GGLVLSMMLSLRDEGVALPAAAALFSPWTDLAATGESIRSNNEKCAMFE
GAGVAYSARYYVGEMDARNPLVSPLYADFQGLPPLLIHVGEDEVLRDDST
RLAKRARAAGVPVDLKVWPVVPFAWQLAPHLIPEARQSLQESAAFLRKHL
PSAVAEQEAVAR

>LipY_orfG

MetRFSCLKKAVTHIRPVMetLVPVIIGIAPLLLSCGSGAMetLRPPALG
GYSLVWSDEFSGADGSSPDRSKWSFDTGVGGNGWGNNELETYTNRTQN
AQIKGGNLVITAMetKETYADPSDGVTRNYTSARLKTEGLFSQAYGRFEASI
KIPAGQGMetWPAFWMetLGNNIPSVGWPDCEIDIMetENIGNEPGIVHGSL
HGPSTVGPTSDATAPFSLPAGQKFADAFHLYAVEWEPTVRFYVDANLY
ATFTSAEWPAGGTWTFDHPFFIILNVAVGGKWPGSPEQHHGVSSTNAG

>LipW_orfW

MAFTQNQGAKIYWDEQGSGBPILLIMGLGYSSDMWHRSRPVLAAG
YRTIAFDNRGVGRSDVPPGPYSMAIMASDGA AVLDAAGIERAHVFGVSM
GGMIAQEFVLQYPNRVRSVLGCTASGGPQAVRADGDDLQALTRRGASP
KEATEAIVPFIYDPATPRHLIDEDIKIRLQWYPTAEGYMAQLMAIFEWEAY
SRISQITAPTLLIHGESDRLVPAANSKLIAARIPEAKLVLLPHASHIFSTDQ
PAATHHAILDFLAAQSNHKQTAQA

Referência bibliográfica

- Açikel U, Ersan M, Açikel YS. 2010. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. In: Food and Bioproducts Processing, Rugby, v. 88, pp. 31-39.
- Arpigny JL, Jaeger KE. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. In: Biochemical Journal, 343, pp. 177–183.
- Atlas RM, Bartha R. 1998. Microorganisms and their natural habitats: microbiology of air, water and soil. In: Microbial ecology: Fundamentals and applications, 4th edn. Benjamin/Cummings Science Publishing. Menlo Park, CA, pp. 329–376.
- Balashev K, Jensen TR, Kjaer K, Bjørnholm T. 2001. Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces. Part I. Atomic force microscopy. In: Biochimie, 83, pp. 387–397.
- Barnard D, Casanueva A, Tuffin M, Cowan D. 2010. Extremophiles in biofuel synthesis. In: EnvironTechno;31, pp. 871–88.
- Bergmann JC, Tupinambao DD, Costa OYA, Almeida JRM, Barreto CC, Quirino BF. 2013. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. In: Renewable and Sustainable Energy Reviews, 21, pp. 411-420.
- Bornscheuer UT. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application. In: Biocatalysis, FEMS Microbiol Rev, v.26, n.1, Mar, pp.73-81.
- Boutaiba S; Bhatnagar T; Hacene H; Mitchell DA; Baratti J. 2006. Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. In: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.41, pp. 21-26,
- Brozzoli V, Crognale S, Sampedro I, Federici F, D'Annibale A, Petruccioli M. 2009. Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. In: Bioresource Technology, Essex, v. 100, p. 3395-3402.
- Burket JFM, Maugeri F, Rodrigues MI. 2008. Optimization of extracellular lipase production by characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). In: Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 42, pp. 381-388.
- Cammarota MC, Freire DMG. 2006. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil grease content. In: Bioresource Technology, Essex, v. 97, pp. 2195-2210.

Carvalho PO, Calafatti SA, Marassi M, Silva DM, Contesini FJ, Bizaco R, Macedo GA. 2005. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas, In: Química Nova, v. 28, pp. 614-621,

Comménil P, Belingheri L, Bauw G, Dehorter B. 1999. Molecular characterization of a lipase in *Botrytis cinerea* by components of grape berry cuticle. In: Physiological and Molecular Plant Pathology, London, v. 55, pp. 37-43.

Costas M, Deive FJ, Longo MA. 2004. Lipolytic activity in submerged cultures of *Issatchenkia orientalis*. In: Process Biochemistry, London, v. 39, pp. 2109-2114.

Côté A, Shareck F. 2008. Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). In: Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 42, pp. 381-388.

Cygler M, Schrag JD. 1999. Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. In: Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 1441, pp. 205–214.

Dalmau E, Montesinos JL, Lotti M, Casas C. 2000. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. In: Enzyme and Microbial Technology, New York, v.26, pp. 657-663.

Dandavate V, Jinjala J, Keharia H, Madamwar D. 2009. Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. In: Bioresource Technology, 100, pp. 3374–3381.

De Castro HF, Mendes AA, Santos JC, Aguiar CL. 2004. Modificação de óleos gorduras por biotransformação. In: Revista Química Nova, v. 27, n. 1, pp. 146-156.

Demarche P, Junghanns C, Nair RR, Agathos SN. 2011. Harnessing the power of enzymes for environmental stewardship. In: Biotechnology Advances.

Diaz JCM, Rodrigues JA, Roussos S, Cordova J, Aboualham A, Carriere F, Baratti J. 2006. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. In: Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 39, pp. 1042-1050.

Doukyu N, Ogino H. 2010. Organic solvent-tolerant enzymes. In: Biochemical Engineering Journal, 48, pp. 270–282.

Edwinoliver NG, Thirunavukarasu K, Naidu RB, Gowthaman MK, Nakajima KT, Kamini NR. 2010. Scale up of a novel tri-substrate fermentation for enhanced production of *Aspergillus niger* lipase for tallow hydrolysis. In: Bioresource Technology, Essex, v. 101, pp. 6791-6796.

Elend C, Schmeisser C, Hoebenreich H, Steele HL, Streit WR. Isolation and characterization of a metagenome-derived and cold-active lipase with high

estereospecificity for (R)-ibuprofen esters. In: Journal of Biotechnology, v. 130, n. 4, pp. 370-377.

Ferrer M, Golyshina OV, Chernikova TN, Khachane AN, Martins dos Santos VAP, Yakimov MM, Timmis KN, Golyshin PN. 2005. Microbial Enzymes Mined from the Urania Deep-Sea Hypersaline Anoxic Basin. In: Chemistry & Biology, v. 12, n. 8, pp. 895-904.

Ferrer M, Reyes-Duarte D, Golyshina OV, Chernikova TN, Khachane AN, Martins dos Santos VAP, Strompl C, Elborough K, Jarvis G, Neef A, Yakimov MM, Timmis KN, Golyshin PN. 2005. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. In: Environmental Microbiology, v. 7, n. 12, pp. 1996-2010.

Finkelstein AE, Strawich ES, Sonnino S. 1970. Characterization and partial purification of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. In: Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology, 206, pp. 380-391.

Fischer M, Pleiss J. 2003. The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families. In: Nucleic Acids Research, 31, pp. 319-321.

Flores MV, Naraghi K, Engasser JM, Halling PJ. 2002. Influence of glucose solubility and dissolution rate on the kinetics of lipase catalyzed synthesis of glucose laurate in 2-methyl 2-butanol. In: Biotechnology and Bioengineering, 78, pp. 815-821.

Fojan P, Jonson PH, Petersen MT, Petersen SB. 2000. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. In: Biochimie, 82, pp. 1033-1041.

Fukuda H, Kondo A, Noda H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. In: J Biosci Bioeng, 92, pp. 405-416

Fukuda HA, et al., 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. In: J Biosci Bioeng, v.92, n.5, pp.405-16.

García-Alles LF, Gotor V. 1998. Lipase-catalyzed transesterification in organic media: Solvent effects on equilibrium and individual rate constants. In: Biotechnology and Bioengineering, 59, pp. 684-694.

Gopinath SCB, Hilda A, Priya TL, Annadurai G. 2002. Purification of lipase from *Cunninghamella verticillata* and optimization of enzyme activity using response surface methodology. In: World Journal of Microbiology & Biotechnology, Oxford, v. 18, pp. 449-458.

Gotor-Fernández V, Brieva R, Gotor V. 2006. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. In: Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic, 40, pp. 111-120.

Gulati R, Isar J, Kumar V, Prasad AK, Parmar VS, Saxena RK. 2005. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. In: Pure and Applied Chemistry, Oxford, v. 77, pp. 251-262.

- Gulati R, Isar J, Kumar V, Prasad AK, Parmar VS, Saxena RK. 2005. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. In: *Pure and Applied Chemistry*, Oxford, v. 77, pp. 251-262.
- Guncheva M, Zhiryakova D. 2011. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68, pp. 1–21.
- Gupta NG, et al. 2004. A glycerol-inducible thermostable lipase from *Bacillus* sp.: medium optimization by a Plackett-Burman design and by response surface methodology. In: *Can J Microbiol*, v.50, n.5, pp.361-368.
- Gupta RN, et al. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. In: *Appl Microbiol Biotechnol*, v.64, n.6, pp.763-781.
- Ha SH, Lan, MN, Lee SH, Hwang SM, Koo YM. 2007. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids. In: *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, pp. 480–483.
- Hall T. 2007. BioEdit: Biological sequence alignment editor for Win95/98/NT/2K/XP [Online]. Website last modified on June 27, 2007.
- Handelsman, J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. In: *Microbiol Mol Biol Rev*, 68, pp. 669-685.
- Hasan F, Shah AA, Hameed A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, pp. 235–251.
- Hegedus DD, Khachatourians GG. 1988. Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. In: *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v. 10, pp. 637-342.
- Holwerda K, Verkade PE, Willigen, AHA. 1936. Recl. Trav. In: *Chim.Pays-Bas*, v. 55, p.43, 1936.
- Horchani H, Mosbah H, Salem NB, Gargouri Y, Sayari A. 2009. Biochemical and molecular characterisation of a thermoactive, alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* strain. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56, pp. 237–245.
- Hu YF, Fu CZ, Huang YP, Yin YS, Cheng G, Lei F, Lu N, Li J, Ashforth EJ, Zhang LX, Zhu BL. 2010. Novel lipolytic genes from the microbial metagenomic library of the South China Sea marine sediment. In: *FEMS Microbiology Ecology*, v. 72, n. 2, pp. 228-237.
- Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. In: *Annual Review of Microbiology*, 53, pp. 315–351.
- Jaeger KE, Eggert T. 2002. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, pp. 39–46.
- Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, van Heuvel M, Misset O. 1994. Bacterial lipases. In: *FEMS Microbiology Reviews*, 15, pp. 29–63.

- Jaeger KE, Eggert T. 2002. Lipases for biotechnology. In: *Curr Opin Biotechnol*, v.13, n.4, pp.390-397.
- Jaeger KE, Reetz MT. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. In: *Trends in Biotechnology*, 16, pp. 396–403.
- Jeon JH, Kim JT, Kang SG, Lee JH, Kim SJ. 2009. Characterization and its potential application of Two Esterases Derived from the Arctic Sediment Metagenome. In: *Marine Biotechnology*, v. 11, n. 3, pp. 307-316.
- Jochens H, Hesseler M, Stiba K, Padhi SK, Kazlauskas RJ, Bornscheuer UT. 2011. Protein engineering of α/β -hydrolase fold enzymes. In: *Advances in Applied Microbiology*, 47, pp. 33–78
- Jochens H, Hesseler M, Stiba K, Padhi SK, Kazlauskas RJ, Bornscheuer UT. 2011. Protein engineering of α/β -hydrolase fold enzymes. In: *ChemBioChem*.
- Jones WJ. 2010. High-Throughput Sequencing and Metagenomics. In: *Estuaries and Coasts*, v. 33, n. 4, pp. 944-952.
- Kambourova M, Kirilova N, Mandeva R, Derekova A. 2003. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Amsterdam, v. 22, pp. 307-313.
- Kempka AP, Lipke NL, Pinheiro TLF, Menoncin S, Treichel H, Freire DMG, Di Luccio M, Oliveira D. 2008. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering*, Berlin, v. 31, pp. 119-125.
- Khattabi M, Gelder P, Bitter W, Tomamassen J. 2003. Role of the calcium ion and the disulfide bond in the *Burkholderia glumae* lipase. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Amsterdam, v. 22, pp. 329-338.
- Kim JTSG, et al.. 2007. Screening and its potential application of lipolytic activity from a marine environment: characterization of a novel esterase from *Yarrowia lipolytica* CL180. In: *Appl Microbiol Biotechnol*, v.74, n.4, pp. 820-828.
- Kim JW, Shim YS, Yoon SS. 1997. Isolation and purification of a lipase from *Pseudomonas* sp. Y0103 isolated from raw milk. In: *Korean Journal of Dairy Science*, 19, pp. 17–24.
- Kim YH, Kwon EJ, Kim SK, Jeong YS, Kim J, Yun HD, Kim H. Molecular cloning and characterization of a novel family VIII alkaline esterase from a compost metagenomic library. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 393, n. 1, pp. 45-49.
- Kim YJ, Choi GS, Kim SB, Yoon GS, Kim YS, Ryu YW. 2006. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. *Protein Expression and Purification*, v. 45, n. 2, pp. 315-323.

Kojima Y, Shimizu S. 2003. Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. In: Journal of Bioscience and Bioengineering, Osaka, v. 96, pp. 219-226.

Lammle K, Zipper H, Breuer M, Hauer B, Buta C, Brunner H, Rupp S. 2007. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. In: Journal of Biotechnology, v. 127, n. 4, pp. 575-592.

Lee MH, Lee CH, Oh TK, Song JK, Yoon JH. 2006. Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: Evidence for a new family of bacterial lipases. In: Applied and Environmental Microbiology, v. 72, n. 11, pp. 7406- 7409.

LEE, S. W.; WON, K.; LIM, H. K.; KIM, J. C.; CHOI, G. J.; CHO, K. Y. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 65, n. 6, p. 720-726, 2004.

Leresche JE, Meyer HP. 2006. Chemocatalysis and biocatalysis. (Biotransformation): some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. In: Org Proc Res, 10, pp. 572–580.

Li D, Wang B, Tan T. 2006. Production enhancement of *Rhizopus arrhizus* by feeding oleic acid. In: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Amsterdam, v. 43, pp. 40-43.

Li G, Wang K, Liu YH. 2008. Molecular cloning and characterization of a novel pyrethroidhydrolyzing esterase originating from the Metagenome. In: Microbial Cell Factories, v. 7, pp. 38.

Liaw RB, Cheng MP, Wu MC, Lee CY. 2010. Use of metagenomic approaches to isolate lipolytic genes from activated sludge. In: Bioresource Technology, v. 101, n. 21, pp. 8323- 8329.

Lin E, Ko H. 2005. Glucose stimulates production of the alkaline-thermostable lipase of the edible basidiomycete *Antrodia cinnamomea*. In: Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 37, pp. 261-265.

Liu DN, Trodler P, Eiben S, Koschorreck K, Muller M, Pleiss J, Maurer SC, Branneby C, Schmid RD, Hauer B. 2010. Rational Design of *Pseudozyma antarctica* Lipase B Yielding a General Esterification Catalyst. In: Chembiochem, v. 11, n. 6, p. 789-795.

Lotti M, Alberghina L. 2007. Lipases: molecular structure and function. In: Polaina J. MacCabe AP (Eds.) Industrial enzymes: structure, function and applications, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 275.

Messias JM, Costa BZ, Lima VMG, Dekker RFH, Rezende MI, Krieger N, Barbosa AM. 2009. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. In: Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 45, pp. 426-431.

Mine Y, Fukunaga K, Yoshimoto M, Nakao K, Sugimura Y. 2001. Modification of lipases with poly(ethylene glycol) and poly(oxyethylene) detergents and their catalytic activities in organic solvents. In: Journal of Bioscience and Bioengineering, 92, pp. 539–543.

Ministério de Minas e Energia – 2013

Miranda OA, Salgueiro AA, Pimentel MCB, Lima Filho JL, Durán N. 1999. Lipase production by a brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. In: Bioresource Technology, Essex, v. 69, pp. 145-147.

Mosbah H, Sayari A, Horchani H, Gargouri Y. 2007. Involvement of Gly 311 residue on substrate discrimination, pH and temperature dependency of recombinant *Staphylococcus xylosoe* lipase: A study with emulsified substrate. In: Protein Expression and Purification, San Diego, v. 55, pp. 31-39.

Ogino H, Inoue S, Akagi R, Yasuda M, Doukyu N, Ishimi K. 2008. Refolding of a recombinant organic solvent-stable lipase, which is overexpressed and forms an inclusion body, and activation with lipase-specific foldase. In: Biochemical Engineering Journal, 40, pp. 507–511.

Panzavolta F, Soro S, D'Amato R, Palocci C, Cernia E, Russo MV. 2005. Acetylenic polymers as new immobilization matrices for lipolytic enzymes. In: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 32, pp. 67–76.

Parente ES. 2003. Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado. In: Tecbio, Fortaleza, p. 66.

Park JY, Kim DK, Lee JP, Park SC, Kim YJ, Lee JS. 2008. Blending effects of biodiesels on oxidation stability and low temperature flow properties. In: Bioresource. Technol, 99, pp. 1196– 1203.

Park JY, Kim DK, Wang ZM, Lu P, Park SC, Lee JS. 2008. Production and characterization of biodiesel from tung oil. In: Appl. Biochem. Biotech, 148, pp. 109–117.

Patel RN. 2008. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. In: Coordination Chemistry Reviews, 252, pp. 659–701.

Pouderoyen G, Eggert T, Jaeger KE, Dijkstra BW. 2001. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme. In: J Mol Biol, 309, pp. 215-226

Prasad S, Bocola M, Reetz M. 2011. Revisiting the lipase from *Pseudomonas aeruginosa*: directed evolution of substrate acceptance and enantioselectivity using iterative saturation mutagenesis. In: ChemPhyChem,

Ramani K, Kennedy LJ, Ramakrishnan M, Sekaran G. 2010. Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. In: Process Biochem, 45, pp. 1683-1691.

Ranganathan SV, et al. 2002. An overview of enzymatic production of biodiesel. In: *Bioresour Technol*, v.99, n.10, pp.3975-81. 2008.

Rhee JK, Ahn DG, Kim YG, OH JW. 2005. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. In: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 2, pp. 817-825.

Ribeiro BD, De Castro AM, Coelho MAZ, Freire DMG. 2011. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. In: *Enzyme research*, pp. 615-803.

Rosenau F, Jaeger KE. 2000. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expressions and mechanisms of secretion. In: *Biochimie*, 82, pp. 1023–1032.

Santarossa G, Lafranconi PG, Alquati C, DeGioia L, Alberghina L, Fantucci P, Lotti M. 2005. Mutations in the lidII region affect chain length specificity and thermostability of a *Pseudomonas fragi* lipase. In: *FEBS Letters*, 579, pp. 2383–2386.

Sazena RK, Davidson WS, Sheoran A, Giri B. 2003. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. In: *Process Biochemistry*, London, v. 39, pp. 239-247.

Schoheyder F, Volqvartz K. 1945. On the affinity of pig pancreas lipase for tricaprin in heterogeneous solution. In: *Acta Physiol. Scand.*, v. 9, p. 57-67.

Shah DB, Wilson JB. 1965. Egg yolk factor of *Staphylococcus aureus* In: *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 89, pp. 949-953.

Simon LM, László K, Vértési A, Bagi K, Szajáni B. 1998. Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4, pp. 41–45.

Simons JW, Van Kampen MD, Riel S, Gotz F, Egmond MR, Verheij HM. 1998. Cloning, purification and characterization of the lipase from *Staphylococcus epidermises*: Comparison of the substrate selectivity with those of other microbial lipases. In: *European Journal of Biochemistry*, Berlin, v. 253, pp. 675-683.

Sommer P, Bormann C, Gotz F. 1997. Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnameus*. In: *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 63, p. 3553-3560.

Stehr F, Kretschmar M, Kröger C, Hube B, Schäfer W. 2003. Microbial lipases as virulence factors. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22, pp. 347–355.

Sunna AL, Hunter CA, Hutton PL. 2002. Biochemical characterization of a recombinant thermoalkalophilic lipase and assessment of its substrate enantioselectivity. In: *Enzyme Microbiol. Technol.*, 31, pp. 472-476.

- Toida J, Fukuzawa M, Kobayashi G, Ito K, Sekiguchi J. 2000. Cloning and sequencing of the triacylglycerol lipase gene of *Aspergillus oryzae* and its expression in *Escherichia coli*. In: FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 189, pp. 159-164.
- Tom RA, Crisan EV. 1975. Assay for lipolytic and proteolytic activity using marine substrates. In: Applied Microbiology, Washington, v. 29, pp. 205-210.
- Torsvik V, Ovreas L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. In: Curr Opin Microbiol, 5, pp. 240–245.
- Uchiyama T, Miyazaki K. 2009. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. In: Current Opinion in Biotechnology, v. 20, n. 6, pp. 616-622.
- Villeneuve P, Lopez-Giraldo LJ, Laguerre M, Lecomte J, Figueroa-Espinoza MC, Barouh N, Baréa B, 2007. Lipase-catalyzed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium. In: Enzyme Microb Technol, 41, pp. 721-726.
- Wei P, Bai LP, Song WG, Hao GP. 2009. Characterization of two soil metagenomederived lipases with high specificity for p-nitrophenyl palmitate. In: Archives of Microbiology, v. 191, n. 3, pp. 233-240.
- Xing MN, Zhang XZ, Huang H. 2012. Application of metagenomic techniques in mining enzymes from microbial communities for biofuel synthesis. In: Biotechnology advances, 30, 920–9. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.01.021
- Yang KS, Sohn JH, Kim HK. 2009. Catalytic properties of a lipase from *Photobacterium lipolyticum* for biodiesel production containing a high methanol concentration. In: Journal of Bioscience and Bioengineering, Osaka, v. 107, pp. 599-604.
- Yoo HY, Simkhada JR, Cho SS, Park DH, Kim SW, Seong CN, Yoo JC. 2011. A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. In: Bioresource Technology, Essex, v. 102, pp. 6104-6111.
- Yoon JH, Kang SJ, Lee CH, Oh TK. 2007. *Nocardioides insulae* sp. nov. isolated from soil. In: Int J Syst Evol Microbiol, 57, pp. 136–140.
- Yoshida F, Motai H, Ichishima E. 1968. Effect of lipid materials on the production of lipase by *Torulopsis ernobii*. In: Applied Microbiology, Washington, v. 16, pp. 845-847.